

DISEÑO DE BIOCATALIZADORES DE LIPASAS Y SU APLICACIÓN EN BIOPROCESOS



Memoria presentada para optar al grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid

Cristina García Galán
Ingeniera química

DIRECTORES:

Roberto Fernández Lafuente
Rafael Costa Rodrigues

Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias



Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2014

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad por la beca asociada a mi tesis doctoral para la Formación de Personal Investigador en la convocatoria 2010.

Quisiera dar las gracias a Joaquín Pérez Pariente y a José Carlos Conesa Cegarra, directores del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica en el período de disfrute de mi beca, por todas las facilidades y los medios para llevar a cabo esta tesis.

También, agradecer a mi tutor de tesis, José Berenguer Carlos, por su disponibilidad y ayuda.

Agradezco especialmente a mis directores de tesis: a Roberto Fernández Lafuente, por darme la oportunidad de realizar esta tesis, por estar siempre accesible, por su gran dedicación, su positividad, y sus ilimitadas ideas. A Rafael Costa Rodrigues por la cálida bienvenida en Porto Alegre, por su paciencia en sus explicaciones y por ser un ejemplo a seguir.

En estos cuatro años me han acompañado diferentes personas que han hecho el trabajo más ameno, y de las que he aprendido muchas cosas. Muchas gracias a Karel, por ser mi guía en los primeros días en el instituto; a Javi y Fernando, por ser muy buenos compañeros y ser mis referentes por su calidad y manera de trabajar. Gracias a Oveimar por ser un gran profesor en el laboratorio, al que le debo mis mejores electroforesis.

Gracias a Ernandes por los meses que pasó conmigo en el laboratorio. Gracias a Cleiton por su compañía el tiempo que he trabajado con él, por enseñarme a tener paciencia cuando las cosas no salen tan bien, y a apreciar el trabajo en equipo. También gracias a Carmen y a Ramiro.

De mi estancia en Brasil quisiera agradecer a mis compañeras de laboratorio, a Carla, Jakeline, Joana, Natália, Daiane, y especialmente a mi amiga y compañera Andrea, muchas gracias por toda tu ayuda y por hacerme mucha compañía.

Por último, quiero dar las gracias a mis compañeras y amigas, Marina y Victoria, por los comienzos, y también, a Andreina, por los momentos compartidos y el apoyo que me han mostrado todas ellas.

Sin el apoyo de mis amigos y familia nada de esto tendría sentido, por los grandes gestos y los pequeños del día a día, muchas gracias. Gracias, por todo lo demás.

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	3
2.1	La Biocatálisis	3
2.2	Desarrollo y mejora de biocatalizadores enzimáticos. Inmovilización.-	4
2.3	Las lipasas. Activación interfacial.....	7
2.4	Inmovilización en soportes hidrofóbicos. Resina de Poliestireno-divinil benceno como soporte para inmovilizar lipasas.	9
2.5	Bioprocesos. Esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas.	11
2.6	Agitación mediante la tecnología de los ultrasonidos.	15
3	OBJETIVOS DEL TRABAJO	17
4	MATERIALES.....	19
5	MÉTODOS	21
5.1	Preparación de biocatalizadores en soportes hidrofóbicos.	21
5.1.1	Medida de la concentración de proteína en disoluciones enzimáticas.....	21
5.1.2	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	21
5.1.3	Medida estándar de la actividad enzimática.	21
5.1.4	Preparación del soporte.	22
5.1.5	Inmovilización.....	23
5.1.6	Determinación de la capacidad de carga.....	24
5.1.7	Incubación en diferentes medios inactivantes.....	24
5.1.8	Reacciones de hidrólisis con diferentes sustratos.....	25
5.2	Reacciones de medio orgánico.	28
5.2.1	Transesterificación: producción de biodiesel	28
5.2.2	Reacciones de esterificación: producción de aromas.	29
6	RESULTADOS.....	33
6.1	Preparación de biocatalizadores en soportes hidrofóbicos.	33

6.1.1	Biocatalizadores de CalB.....	33
6.1.2	Biocatalizadores de TLL, RML y Lecitasa.....	37
6.2	Bioprocesos.....	41
6.2.1	Transesterificación.....	41
6.2.2	Síntesis de ésteres aromáticos.....	46
6.3	Esterificación mediante agitación por ultrasonidos.....	70
6.3.1	Esterificación catalizada por CalB mediante agitación por ultrasonidos.....	70
7	DISCUSIÓN.....	77
7.1	Preparación de biocatalizadores en soportes hidrofóbicos.....	77
7.1.1	Biocatalizadores de CalB.....	77
7.1.1	Biocatalizadores de TLL, RML y Lecitasa.....	79
7.2	Biotransformaciones.....	84
7.2.1	Transesterificación.....	84
7.2.2	Diseño experimental.....	85
7.2.3	Comparación del curso de la transesterificación bajo condiciones óptimas.....	85
7.2.4	Reutilización de los biocatalizadores.....	86
7.3	Síntesis de ésteres aromáticos.....	86
7.3.1	Comparación de los biocatalizadores comerciales en reacciones de esterificación.....	86
7.3.2	Comparación del nuevo biocatalizador CalB-MCI y el comercial, Novozym 435 en reacciones de esterificación.....	88
7.3.3	Comparación del nuevo biocatalizador TLL-MCI y el comercial, TL-IM en reacciones de esterificación.....	93
7.4	Esterificación mediante agitación por ultrasonidos.....	95
7.4.1	Diseño experimental.....	95
7.4.2	Esterificación en condiciones óptimas.....	95
7.4.3	Reutilización del biocatalizador.....	95
7.4.4	Efecto de la concentración de ácido sobre la actividad de esterificación.....	96
8	CONCLUSIONES.....	97

9	BIBLIOGRAFÍA	99
10	ANEXOS	105
10.1	Publicaciones	105
10.1.1	Artículos enviados:	125
10.1.2	Artículos relacionados con la tesis:	125
10.2	Índice de Figuras.....	126
10.3	Índice de tablas	132

1 RESUMEN (SUMMARY)

The need for updating the existing processes, or finding new methods to meet environmental and legislation requirements, is an imminent task for all Chemical Industries. The path towards sustainability encourages the interest to find alternatives to traditional methods; this way, biocatalysis appears as a potential alternative to cope with the basis of a 'greener' chemistry. The use of enzymes as catalysts includes important advantages: mild operational conditions (temperature, pressure and pH), the possibility of shortening the steps of synthesis using high efficient, and selective transformations, as well as, obtaining safer and purer chiral products. Nevertheless, to call the attention of industrial transformations, enzymes must gather a set of improvements before their application. In this concern, in the last decades, a wide research in different enzymatical, biological and engineering fields, has been developed and definitely, contributed to the emergence of the first biotransformations in the Industry.

Immobilization is a powerful tool that when carefully designed, could deal with some of the drawbacks of enzymes as biocatalists for industrial applications, and improve interesting properties; this tool is the simplest way for to reduce the cost of the enzymatic biocatalists, making them reusable; but it also may stabilize the enzyme or change its specificity.

In this thesis, a group of lipases were immobilized in different hydrophobic supports. This is an easy-to-perform method that gathers immobilization and purification. The pool of immobilized lipases prepared, and other commercial available biocatalists, were studied and compared in terms of stability against several inactivating media and activity using different substrates. Two important biotransformations were also studied using these biocatalysts; esterifications, employed for the production of aroma and flavours under natural label, and transesterification, for the production of biodiesel.

Albeit, results obtained showed some negative effects regarding thermal stability, thanks to this simple way for the immobilization of lipases, it could be possible to partition hydrophilic and deleterious substances away from the hydrophobic microenvironment of the immobilized enzyme. Thus, the immobilized lipases could be used in very heterogeneous media where several phases exist and even mechanical agitation is not capable to promote mass transfer through the different phases.

Finally, the use of agitation under ultrasound technology was analyzed as an approach to improve mass transfer in esterification; results showed improvements especially in the reactions carried out by commercial biocatalysts immobilized in hydrophilic supports.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 La Biocatálisis

La biocatálisis consiste en la utilización de sustancias de origen biológico como catalizadores para llevar a cabo una transformación química de interés industrial. Surge como una tecnología competitiva que ofrece rutas alternativas o complementarias a la catálisis química tradicional; uno de sus mayores atractivos es ofrecer procesos más limpios y selectivos, lo que invita, a la biocatálisis, a contribuir en la inminente tendencia a la sostenibilidad de la industria química.

Las estructuras biológicas con actividad catalítica utilizadas en biocatálisis pueden ser, células, enzimas, anticuerpos catalíticos (abzimas) o ribozimas. De este grupo, las abzimas y los ribozimas no tienen aplicaciones industriales descritas en la actualidad, mientras que existen numerosos biocatalizadores enzimáticos desarrollados y utilizados en procesos de la industria química (Straathof A.J.J. y col. 2005).

En los sistemas biológicos, las enzimas catalizan el conjunto de reacciones químicas desarrolladas en los organismos; se trata de proteínas con funciones específicas cuya actividad catalítica en condiciones fisiológicas, está regulada y optimizada para mantener la funcionalidad y la integridad del organismo. La aplicación de enzimas como biocatalizadores en un proceso industrial no implica necesariamente su utilización bajo las condiciones biológicas, por lo que su actuación, estabilidad, y selectividad será diferente, y deberá ser estudiada para el proceso en concreto.

Conceptos como la reducción de costes, la mejora de la calidad, la seguridad, la protección de la salud, o los requisitos medioambientales, son algunos de los retos a los que se enfrenta la industria química, y que podrían ser solventados mediante la implementación a nivel industrial, de la tecnología desarrollada en el campo de la biocatálisis (Wohlgemuth R. 2010). El crecimiento de la presencia de nuevas biotransformaciones en la industria está acompañado del importante desarrollo de las técnicas en biología molecular tanto a nivel experimental, como la contribución de las herramientas bioinformáticas, la ingeniería de proteínas, como por ejemplo, la evolución dirigida. La biocatálisis hoy, está presente en procesos de síntesis en química fina y química básica, en la producción de disolventes orgánicos, materias primas para polimerizaciones; productos de

partida para la síntesis de compuestos farmacéuticos y agroquímicos, o en la síntesis de principios activos para la industria farmacéutica, antibióticos, sustancias utilizadas como edulcorantes, en la industria alimentaria, y vitaminas (Bommarius A.S. y col. 2011, Schoemaker H.E. y col. 2003, Zaks A. 2001).

Desde el punto de vista químico, los procesos biocatalíticos ofrecen ciertos atractivos frente a la catálisis química tradicional; las enzimas, presentan una alta regio-, y/o enantio-selectividad. La alta selectividad de los biocatalizadores supone, desde el punto de vista del proceso, la simplificación de las operaciones; lo que puede conducir hacia una disminución del número de pasos intermedios de reacción, una reducción de los procesos de separación o de purificación del producto, un menor consumo de materias primas, o un menor consumo energético.

Así, mediante una adecuada selección de la enzima que actuará como fase activa del biocatalizador, es posible diseñar el esquema de reacción de un proceso, minimizando el número de reacciones secundarias (Hasan F. y col. 2006).

Además, otras ventajas del uso de biocatalizadores son, las condiciones suaves de reacción, en cuanto a pH, cercanos a la neutralidad, y temperaturas y presiones ambientales (Dordick J.S. 1991, Liese A. y col. 2006). Un ejemplo de un proceso industrial mejorado por la aplicación de la biocatálisis, es el desarrollado por la compañía japonesa Nitto Chemical para la producción de acrilamida. El proceso tradicional trabaja a temperaturas entre 80-140°C, usa un catalizador de Cu que genera subproductos tóxicos, y se produce ácido acrílico como subproducto. El proceso enzimático alternativo opera a 10°C para generar un 100% de acrilamida (Dordick J.S. 1991, Straathof A.J.J. y col. 2002).

2.2 Desarrollo y mejora de biocatalizadores enzimáticos. Inmovilización.-

El diseño de un proceso biocatalítico comprende diferentes fases, algunas de ellas tratan el estudio de las características físicas de la reacción, el diseño del reactor, las etapas de separación, etc. Otras, afectan al propio biocatalizador; en primer lugar, el desarrollo del biocatalizador comienza con la producción de la enzima o sistema enzimático. A continuación, una vez se dispone de las enzimas en su forma soluble, se mejoran sus propiedades de operación: para conferir la necesaria integridad al derivado enzimático, permitir su utilización en repetidos ciclos de operación, además de optimizar propiedades importantes que son reconocidas limitaciones de las

enzimas como biocatalizadores: la pureza de la disolución enzimática disponible, la estabilidad, la actividad, la especificidad, la selectividad, o la inhibición por presencia de sustancias en el medio de reacción.

Las enzimas suelen tener un origen microbiano, aunque también pueden ser obtenidas a partir de plantas y animales (Hasan F. y col. 2006). Para disponer de ellas en forma soluble, se utilizan técnicas de producción y aislamiento ampliamente desarrolladas a nivel industrial, una de las formas más habituales es la fermentación.

Posteriormente a la selección, producción y aislamiento, las enzimas son estabilizadas en el medio de reacción haciendo uso de diferentes estrategias; entre ellas se incluye, la modificación química, la inmovilización en matrices sólidas, la formación de agregados, y técnicas de biología molecular como la mutagénesis dirigida o la evolución dirigida (Illanes A. 2008).

Estas técnicas pueden ser complementarias, de tal manera que se utilicen varias de ellas conjuntamente para mejorar las propiedades del biocatalizador en el proceso; por ejemplo, la utilización de técnicas de modificación química o genética para la mejora de enzimas que han sido previamente inmovilizadas (Cowan D.A. y col. 2011, Hernández K. y col. 2011a, Rodrigues R.C. y col. 2008).

Por sí sola, la inmovilización representa un método tradicional ampliamente usado para la mejora de catalizadores enzimáticos. Este método, si es adecuadamente diseñado, puede conferir al biocatalizador casi todas las propiedades deseadas: estabilidad, actividad, especificidad y selectividad, reducción de la inhibición (Mateo C. y col. 2007, Palomo J.M. 2009). Si bien, para obtener buenos resultados, es necesario llevar a cabo un estudio exhaustivo sobre el protocolo de inmovilización más apropiado; se prepara una librería de biocatalizadores, realizando ensayos donde se prueban soportes con diferentes propiedades y se estudia el tipo de interacciones entre el soporte y la enzima; se prueban distintas enzimas con la misma función pero diferente origen biológico, de tal manera que difieren en su actividad, estabilidad, o especificidad frente al sustrato; y se trabaja bajo diferentes condiciones de operación, para determinar si éstas afectan o mejoran los resultados de estabilidad, enantio- y regio-selectividad, o si el biocatalizador se ve afectado por la presencia de sustancias del medio, disolventes orgánicos, que puedan actuar como inhibidores, etc.

Existen casos, especialmente en biocatalizadores de lipasas, en los que al inmovilizar una misma enzima en diferentes soportes, se consiguen resultados diferentes en su selectividad, especificidad y actividad (Mateo C. y col. 2007, Hernández K. y col. 2011c).

Una enzima inmovilizada está física o químicamente asociada, o contenida, en un soporte o matriz no esencial para su actividad. La inmovilización permite la utilización de las enzimas en procesos continuos, facilita, la separación del biocatalizador de sus productos, y su reutilización para obtener un precio más competitivo.

Una posible clasificación de los principales métodos de inmovilización es la siguiente (Bickerstaff G.F. 1997):

Inmovilización por adsorción: consiste en la asociación entre la enzima y el soporte a través de mecanismos de interacción superficial reversibles, especialmente interacciones electrostáticas.

Inmovilización por unión covalente: este método implica la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el soporte. El soporte suele tener en su superficie grupos funcionales reactivos que interaccionan con los grupos funcionales de los aminoácidos residuales de la superficie de la enzima.

Atrapamiento: la inmovilización mediante atrapamiento difiere de las anteriores en el hecho de que la enzima está libre en una disolución pero tiene su movimiento restringido por la estructura en red del gel que la contiene.

Encapsulación: consiste en la inmovilización de las enzimas mediante el uso de membranas semipermeables.

Entrecruzamiento: este tipo de inmovilización no requiere soporte; consiste en la obtención de una red tridimensional compleja en la que las enzimas se unen entre sí mediante diferentes mecanismos. La formación de la red puede promoverse por métodos químicos, por adición de un reactivo, o físicos, por floculación. Este método de inmovilización es poco utilizado por sí solo, ya que los derivados enzimáticos obtenidos presentan malas propiedades de estabilidad y resistencia mecánica.

La inmovilización en soportes sólidos disponibles a nivel comercial, es uno de los métodos más utilizados, bien sea mediante mecanismos de inmovilización reversible, o utilizando interacciones por unión covalente (García-Galán C. y col.). En este caso, para que el precio final del

biocatalizador no sea inviable para una posible aplicación industrial, el precio del soporte debe ser razonable.

Un ejemplo de soportes útiles para la inmovilización de enzimas son los propuestos gracias al desarrollo de la nanotecnología; las nanopartículas o nanosólidos presentan sin embargo, un alto coste, de tal manera que su aplicación industrial es hoy en día, inviable, pero sí podrían ser utilizados en el desarrollo de biosensores (Sheldon R.A. 2007).

Otros soportes más comunes, utilizados para la inmovilización de enzimas son, las partículas de agarosa, las zeolitas, el vidrio poroso, las resinas epoxi, la poliacrilamida, la sílice porosa, etc.

Entre los métodos de inmovilización sin soporte, los más populares son los cristales entrecruzados enzimáticos (cuyas siglas en inglés, CLECs) y los agregados entrecruzados enzimáticos (CLEAs).

Algunos ejemplos de las enzimas inmovilizadas usadas a nivel industrial son los descritos a continuación: La obtención de penicilina semisintética se lleva a cabo utilizando la enzima penicilina-G-acilasa inmovilizada por unión covalente a un soporte de poliacrilato. La leche con contenido bajo en lactosa se prepara utilizando lactasa inmovilizada en una resina de intercambio iónico, y para promover la modificación de la grasa se aplica la lipasa TLL inmovilizada en sílica. Por último, la lipasa B de *Candida antarctica* (con nombre comercial Novozym 435), es inmovilizada en poliacrilato, y empleada para la resolución racémica en la obtención de productos farmacéuticos intermedios (Tufvesson P. y col. 2010).

2.3 Las lipasas. Activación interfacial.

Según la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB), existen seis clases de enzimas: las oxidoreductasas, las transferasas, las hidrolasas, las liasas, las isomerasas y las ligasas. De este grupo, las hidrolasas son las enzimas más estudiadas y con mayores aplicaciones a nivel industrial (Dordick J.S. 1991, Loughlin W.A. 2000, Illanes A. 2008). Estas enzimas tienen como función primaria catalizar la hidrólisis de una gran variedad de compuestos, entre los que se encuentran, los ésters y lípidos (esterasas, lipasas), los péptidos y las proteínas (peptidasas, proteasas), o los fosfatos y pirofosfatos (fosfatasas).

Las lipasas (EC 3.1.1.3) constituyen un importante grupo de biocatalizadores aplicados en diferentes campos tecnológicos, gracias a la amplia variedad de sustratos sobre los que actúan, y

reacciones que catalizan, además de su facilidad para ser producidas a escala comercial. La función fisiológica de las lipasas consiste en catalizar reacciones de hidrólisis de enlaces éster-carboxílicos, pero *in vitro*, también son capaces de catalizar las reacciones inversas. Catalizan, reacciones lipolíticas e hidrólisis de otros esteres, y reacciones de síntesis tales como la esterificación, transesterificación, la alcoholisis y la acidolisis (Gandhi N.N. 1997).

Esta versatilidad invita al desarrollo de biocatalizadores con aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica, cosmética, la producción de detergentes, la industria textil y de las pieles, y la industria del papel (Hasan F. y col. 2006).

El diseño de los biocatalizadores de lipasas ha sido impulsado por el conocimiento de la estructura molecular de estas enzimas, ya que estos datos estructurales pueden ayudar a explicar los mecanismos de catálisis de las lipasas (Brzozowski y col. 1991).

Las lipasas presentan un entorno bastante hidrofílico a excepción de la zona donde se localiza el centro activo, y una importante zona que lo rodea, ambas de carácter hidrofóbico. Esta zona hidrofóbica que rodea al centro catalítico es llamada tapadera ('lid', o 'flap'), y puede desplazarse y dar lugar a dos conformaciones en equilibrio que la enzima muestra en medio acuoso homogéneo: la conformación cerrada y la conformación abierta. En la conformación cerrada o inactiva, la tapadera bloquea la zona del centro activo mediante interacciones entre ambas zonas hidrofóbicas. De esta manera, los sustratos no pueden acceder a la zona activa de la enzima.

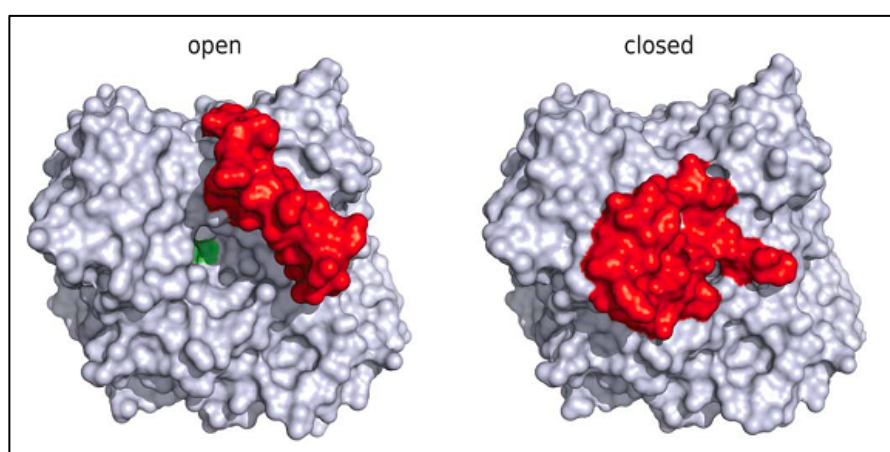


Ilustración 1. Representación de la estructura molecular de una lipasa, (open) conformación activa, (closed), conformación inactiva. Fuente: The University of Texas at El Paso (UTEP), <http://www.bioinformatics.utep.edu/agriculture/MDSim-module.php>.

En la conformación abierta o activa, la tapadera se desplaza y los residuos del centro activo quedan expuestos al medio para su unión al sustrato (Ilustración 1); los residuos de la tapadera que han sido desplazados interaccionan con otra zona de la superficie de la lipasa mediante puentes salinos, enlaces de hidrógeno, etc. (Ortiz López C. C., 2004).

En presencia de su sustrato natural, gotas de aceites y grasas, la forma abierta de la lipasa se adsorbe sobre la interfase hidrofóbica de estos lípidos, de tal forma que se estabiliza su forma abierta, es decir, la lipasa se “activa”. De manera análoga, las lipasas son capaces de experimentar este mismo mecanismo de activación en presencia de interfases hidrofóbicas diferentes a sus sustratos naturales, tales como soportes hidrofóbicos, burbujas de aire, otras proteínas hidrofóbicas e incluso otras lipasas. Este fenómeno es conocido como activación interfacial. La activación interfacial supone un cambio conformacional por el desplazamiento de la tapa hidrofóbica; en ciertos casos, esta tapa es pequeña y no llega a bloquear el centro activo, pero en otros casos, pueden existir incluso tapaderas asociadas, siendo más complejo el mecanismo de activación (Hernández K. y col. 2011d).

2.4 Inmovilización en soportes hidrofóbicos. Resina de Poliestireno-divinil benceno como soporte para inmovilizar lipasas.

Los soportes hidrofóbicos no son muy utilizados para la inmovilización de enzimas ya que, en general, tienen un efecto negativo sobre la estabilidad de las enzimas, produciendo, en ciertos casos, la inactivación instantánea de la enzima (Rodriguez R.C. 2014).

Las proteínas tienen generalmente grupos hidrofílicos en la superficie, mientras que las zonas hidrofóbicas se establecen en las zonas internas de la estructura proteica. La conformación de las proteínas se encuentran en continuo movimiento de tal manera que los bolsillos hidrofóbicos pueden desplazarse hacia el exterior de manera reversible; ahora bien, si estas zonas hidrofóbicas, establecen interacciones con el soporte hidrofóbico, la rigidificación puede afectar a la estabilidad de la enzima, por estabilización de una conformación desnaturalizada.

Sin embargo, en ciertos casos, la utilización de soportes especialmente hidrofóbicos, confiere a la enzima con un microambiente hidrofóbico que la puede proteger de sustancias cuyo efecto sobre la actividad es más nocivo que el propio soporte, de tal manera que la inmovilización en el soporte hidrofóbico procure una mejora en la estabilidad operacional. Por ejemplo, la producción de perácidos, implica la operación del biocatalizador en un ambiente en el que está

presente el agua oxigenada, un importante oxidante que puede inactivar a la enzima en concentraciones muy bajas; en la producción de biodiesel o en las esterificaciones, la acumulación en el ambiente de la enzima, de agua o ácidos carboxílicos, reactivos productos en la reacción, causa una inactivación del biocatalizador. Usando biocatalizadores basados en soportes muy hidrofóbicos, la estabilidad operacional mejora de manera visible (Rodriguez R.C. 2008, Hernández K. y col. 2011a, Martins A.B. 2011).

Las lipasas constituyen una excepción del efecto negativo de la inmovilización de enzimas en soportes hidrofóbicos mediante interacciones físicas.

Un protocolo de inmovilización muy usado con lipasas consiste en utilizar soportes con superficies hidrofóbicas y baja fuerza iónica. Las lipasas confunden el soporte con su sustrato natural de manera que estos promueven la activación interfacial de la enzima dando lugar a la fijación de la conformación abierta sobre la superficie del soporte.

La inmovilización por adsorción en la superficie de soportes hidrofóbicos permite mejorar además otros puntos importantes para la aplicabilidad de la lipasa como biocatalizador (Fernández-Lafuente R. y col. 1998, Mateo C. y col. 2007, Fernández-Lorente G. y col. 2007a):

Después de su inmovilización, la mayoría de las lipasas muestran una actividad mayor a la de la enzima soluble, es decir, pueden llegar a hiperactivarse.

Aunque este tipo de inmovilización implica interacciones fuertes entre el soporte y la lipasa, este es un proceso reversible, por lo que es posible la recuperación del soporte añadiendo detergentes, urea o guanidina.

Este tipo de inmovilización también puede asociarse a un método de purificación de lipasas; los extractos enzimáticos son suministradas con otras proteínas o aditivos en la mezcla. Al promover la inmovilización en condiciones de baja fuerza iónica, las únicas moléculas capaces de estabilizarse en la superficie del soporte hidrofóbico son las lipasas, ya que los centros hidrofóbicos en otras proteínas están más dispersos en toda la molécula y no se estabilizan por interacción con la superficie hidrofóbica del soporte, si no se utiliza un medio estabilizador con alta fuerza iónica.

Se ha observado que la inmovilización por activación interfacial puede modificar la regio- y/o la enantio-selectividad inicial de la lipasa. Modulando las condiciones de operación, por ejemplo el pH, es posible producir uno de los enantiómeros en una determinada reacción

(Fernández-Lorente G. y col. 2007b, Palomo J.M. y col. 2002a). Este hecho puede ser observado en la producción de diacetina a partir de triacetina catalizada por la lipasa B de *Candida antártica* inmovilizada en un soporte hidrofóbico. Mediante la hidrólisis selectiva de triacetina en un solo grupo acetilo, se pueden obtener productos multifuncionales además de sustancias con propiedades quirales, controlando las condiciones del medio como la introducción de un disolvente orgánico (acetonitrilo), y el control del pH (Hernández K. y col. 2011b, Hernández K. y col. 2011c).

Las resinas de poliestireno-divinilbenceno son un tipo de material diseñado en operaciones de separación de compuestos aromáticos, péptidos, esteroides, etc. También son utilizadas para el empaquetado de columnas utilizadas en cromatografía líquida de alta resolución, en fase reversa. Estos sólidos se han utilizado como soportes para enzimas. Dada su alta hidrofobicidad, y el posible efecto negativo en la actividad de la enzima; en algunos casos se han utilizado como soportes previa modificación de su superficie con diferentes sustancias (como por ejemplo, los líquidos iónicos). En el caso de las lipasas se han utilizado estos soportes sin ser modificados.

Las resinas de poliestireno-divinilbenceno están producidas mediante la copolimerización de estireno y divinilbenceno como agente entrecruzante. Durante la preparación de esta resina, ésta puede ser modificada pudiéndose encontrar substituyentes iónicos. Dependiendo del protocolo de preparación seguido, su naturaleza y estructura interna puede ser diferente. Estas matrices tienen una baja capacidad de adsorción de agua en sus poros.

2.5 Bioprocesos. Esterificación y transesterificación catalizadas por lipasas.

Las reacciones de esterificación y transesterificación suponen las aplicaciones de mayor interés catalizadas por lipasas (Dhake K.P. y col 2012). Estas reacciones son de importancia económica en las industrias alimentarias, con la obtención de aromas y fragancias, y en la industria de energías renovables, con la producción de biodiesel (Poppe J.K. y col. 2013).

Mediante esterificaciones o transesterificaciones son producidas sustancias que forman parte de las mezclas que configuran las fragancias y los sabores, compuestos de alto valor añadido; estas sustancias son utilizadas, no sólo en la industria alimentaria sino también se utilizan, para la producción de bebidas, en la industria farmacéutica, y en la obtención de productos de higiene personal (Dhake K.P. y col. 2012). La mayoría de estas sustancias son extraídas de fuentes naturales y muchas de ellas son difíciles de aislar de sus matrices. Por otro

lado, la producción mediante procedimientos basados en la química tradicional suponen operaciones que utilizan catalizadores inorgánicos a temperaturas entre 200-250°C, y la generación de subproductos que contaminan el producto deseado, lo que es una gran desventaja en las aplicaciones para la industria alimentaria y de bebidas.

La elección de bioprocesos catalizados por lipasas inmovilizadas, puede dar la respuesta a la creciente demanda de los productos naturales y funcionales. Mediante la introducción de procesos selectivos, en condiciones de reacción suaves, y mediambientalmente respetuosos, se podrían solucionar los problemas de la extracción natural y de la química tradicional. Por otro lado, la legislación europea favorece este tipo de procesos enzimáticos, permitiendo que estos sean etiquetados como “productos naturales”, lo que automáticamente aumenta su interés de producción comercial.

La reacción de esterificación es en sí, una reacción sencilla entre un ácido carboxílico y un alcohol. Los factores que influyen en el resultado de la esterificación catalizada por lipasas son: la naturaleza del sustrato, la naturaleza del disolvente, la estabilidad térmica de la enzima, y el contenido de agua (Polaina J. y col. 2007).

En la naturaleza del sustrato influye la selectividad de la lipasa hacia ciertas sustancias, bien sea debido al impedimento estérico o a interacciones electrónicas con los sustratos.

Los disolventes utilizados en las reacciones de esterificación determinan la extensión de la velocidad inicial de reacción, la actividad específica, la afinidad por el sustrato, la constante de especificidad, la estabilidad de la enzima y la regio y enantio-selectividad (Sakurai y col., 1988).

Se han utilizado diferentes ambientes para llevar a cabo las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas; los más comunes son los disolventes orgánicos, especialmente no polares. Por otro lado, también se han estudiado procesos en los que se han utilizado líquidos iónicos, o fluidos supercríticos, estos últimos aportan un mayor respeto medioambiental que los disolventes orgánicos (Madeira Lau R. y col. 2000).

En cuanto a la estabilidad térmica, ésta dependerá del estado de la enzima, por ejemplo, si está inmovilizada, el tipo de inmovilización y el micro ambiente al que esté expuesta la enzima durante la reacción, la cantidad de agua disponible en ese ambiente y la interacción con el disolvente.

La cantidad de agua en el medio de reacción juega un papel determinante en la esterificación catalizada por lipasas. En principio, una cierta concentración de agua es necesaria para mantener la conformación activa, y estabilizar a la lipasa en un ambiente no acuoso; sin embargo, un exceso de agua desplazaría el equilibrio de la reacción hacia la hidrólisis. Con el avance de la reacción, la acumulación de agua en el ambiente de la enzima promueve la ralentización de la esterificación por producirse un impedimento al transporte de los substratos (donante de grupo acilo) hacia el centro activo, y de los productos hacia el medio de reacción. Además, superar en cierto valor, la concentración de agua tiene un efecto sobre la estabilidad de la enzima, llegando incluso hasta su inactivación. El agua alrededor de la enzima aporta cierta flexibilidad en su estructura; ésta actúa como un lubricante mediante la formación de enlaces de hidrógeno con la enzima. Sin embargo, cuando la concentración de agua es elevada, la excesiva flexibilidad resulta en la interacción de la enzima y el disolvente orgánico, lo que promueve la desnaturalización de la enzima y su pérdida de actividad.

Así, la actividad de la enzima estará determinada por la inactivación promovida por una concentración de agua excesiva y el impedimento del transporte de compuestos desde el medio de reacción y el microambiente de la lipasa. Aunque las lipasas son activas a baja concentración de agua, existen marcadas diferencias entre los valores óptimos de esta concentración de agua entre lipasas distintas (Polaina J. y col. 2007).

Diferentes maneras se han propuesto para controlar las interfaces presentes en la esterificación: la interfase entre la enzima, el agua presente (inicial y producto) y el disolvente (y los productos); una de ellas es la inmovilización. Para eliminar el exceso de agua, formada como productos, la inmovilización también puede ser una solución, además de la adición de tamices moleculares que atrapan el agua.

Por otro lado, las reacciones de esterificación catalizadas por lipasas, no sólo se han utilizado para la producción de aromas y sabores, sino también en la producción de biodiesel. El producto denominado biodiesel está compuesto por esteres monoalquílicos de ácidos grasos obtenidos mediante la transesterificación, catalizada por ácidos o bases, de aceites vegetales, grasas animales o aceites usados, y alcoholes de bajo peso molecular, como el metanol o el etanol (Poppe J.K. y col. 2013).

Los procesos químicos pueden ser sustituidos por transesterificaciones enzimáticas catalizadas por lipasas inmovilizadas, como manera de dar soluciones a los problemas del alto

consumo energético, la utilización de materias primas con alto contenido de ácidos grasos libres, la recuperación del glicerol, la separación de productos como el agua, y las sales que contaminan el producto, y el hecho de trabajar en condiciones de operación más suaves, generalmente en medio anhidro, orgánico, evitando el ambiente ácido o básico del proceso químico tradicional (Bajaj A. y col. 2010).

Las materias primas con alto contenido de ácido graso libre y bajo en aceite o grasa, necesitan un pretratamiento con ácido para poder ser utilizadas en el método químico; en el proceso enzimático, las lipasas no necesitan este pretratamiento.

En el control del proceso es importante la cantidad de agua presente en el medio o actividad de agua. Generalmente, altos contenidos de agua implican un menor rendimiento del proceso, ya que se promueve la hidrólisis de los triglicéridos; además, el agua también está involucrada en procesos de desnaturalización de la enzima; sin embargo, como ocurría en las reacciones de esterificación, cierta cantidad de agua es necesaria para mantener la integridad de la enzima (el agua actúa aportando lubricación a las cadenas polipeptídicas y manteniendo a la enzima en su estructura activa).

Durante la reacción o presentes en los substratos, ciertas sustancias son capaces de inhibir al biocatalizador; estas sustancias son: el metanol, el glicerol, los fosfolípidos (presentes como contaminantes en las materias primas). La manera de controlar los efectos nocivos de estas sustancias puede ser mediante la elección del disolvente adecuado, el alcohol utilizado o estudio de la inmovilización más oportuna.

Para que el proceso sea realmente rentable, es necesario que la enzima pueda ser reutilizada en procesos continuos o en sucesivas etapas discontinuas; para esto, si la enzima está inmovilizada la recuperación es inmediata, sin embargo, puede aparecer pérdida de la actividad por la acumulación de reactivos o productos en el microambiente de la enzima. Este hecho, muchas veces puede ser resuelto lavando el biocatalizador, de tal manera que se consiga arrastrar las sustancias inhibitorias.

Para promover una optimización del proceso de transesterificación se han estudiado biocatalizadores de lipasas combinadas, con especificidad en posiciones diferentes y complementarias (Huang Y. y col. 2010); mediante esta combinación se consiguen biocatalizadores con mayor estabilidad operacional.

2.6 Agitación mediante la tecnología de los ultrasonidos.

Existen bioprocesos catalizados por enzimas donde se ha comprobado el efecto beneficioso de la tecnología de los ultrasonidos en la estabilidad de la enzima, en su actividad, y en la durabilidad del biocatalizador (Rokhina V.E. y col. 2001).

Los ultrasonidos han sido recientemente utilizados

Estudiando y variando los parámetros de los ultrasonidos se pueden inducir diferentes efectos físicos, químicos y biológicos que pueden mejorar la eficiencia de los bioprocesos, aunque para cada caso es necesario un análisis específico.

La tecnología de los ultrasonidos es considerada respetuosa ambientalmente, por su alta eficiencia, necesitar poco material instrumental, y por el efecto de reducir el tiempo de los procesos en comparación con otras vías de agitación tradicional.

Los ultrasonidos pueden clasificarse de acuerdo con el rango de frecuencia, y su potencia. En cuanto a la frecuencia se diferencian, los ultrasonidos de alta frecuencia, para valores de la frecuencia entre 2 y 10MHz; y los ultrasonidos de baja frecuencia, para valores de entre 20 y 100kHz. Los ultrasonidos de alta frecuencia se utilizan en análisis clínicos y la obtención de imágenes para el diagnóstico aplicadas a la medicina. La baja frecuencia es la tecnología convencional aplicada a la limpieza y la soldadura.

Los efectos de los ultrasonidos no ocurren por una interacción directa con las moléculas sino que, el efecto se debe al fenómeno de cavitación. La cavitación consiste en la formación, crecimiento y rotura, de las cavidades formadas en la fase líquida que suponen una liberación de grandes cantidades localizadas de energía. Con la cavitación se generan zonas con alta temperatura; y se pueden formar radicales libres que pueden desencadenar, a temperatura ambiente, reacciones que de otra manera necesitarían condiciones más energéticas para su desarrollo. Además, aparecen turbulencias y micro-circulaciones que favorecen los fenómenos de transporte, y minimizan la resistencia al transporte en sistemas heterogéneos.

En cuanto al efecto de los ultrasonidos sobre las enzimas, valores de la frecuencia entre 10 y 200kHz pueden afectar las estructuras moleculares; la aplicación de ultrasonidos de baja frecuencia no afecta a la estructura secundaria, pero sí puede afectar a la terciaria, regiones, como bucles o dominios de la enzima, por lo que pueden tener efecto sobre su actividad. Sin embargo, el estudio de los efectos de los ultrasonidos sobre las enzimas han dado lugar a resultados

contradictorios; por lo que, la evaluación debe ser individual y dependerá tanto del tipo de enzima, el ambiente en el que se encuentre (en el caso de enzimas inmovilizadas), las condiciones de reacción, y los parámetros de la agitación por ultrasonidos (como son la frecuencia, la potencia y la duración del efecto) (Rokhina V.E. y col. 2001, Kwiatkowska B. y col. 2011).

Actualmente se han utilizado la tecnología de los ultrasonidos combinada con la biotecnología en la mejora de reacciones de transesterificación, o esterificación, en la síntesis de ésters de azúcares, y esteres de sabores (Alves J.S. y col. 2014); también, en otros bioprocesos, como la producción del biodiesel (en cuanto a las operaciones de homogeneización de las materias primas), el diseño de biosensores o los tratamientos biológicos de lodos (Rokhina V.E. y col. 2001).

En esterificación, resultados han demostrado que la tecnología de los ultrasonidos influye en la cinética del proceso, y reduce el tiempo de reacción, por ejemplo, en la producción de ester isopropílico en la síntesis del aceite de palma refinado (Deshmane G.V. y col. 2009). Otro ejemplo es la transesterificación de triglicéridos y ácidos grasos para la producción de biodiesel, proceso en el que utilizando ultrasonidos de frecuencias entre 20-48kHz y una potencia de 120-1200W se consiguen tiempos de reacción de hasta 10min para alcanzar una conversión óptima, comparada con las 10h de la agitación mecánica (Hanh D.H. y col. 2008).

3 OBJETIVOS DEL TRABAJO

- Evaluación de soportes de poli-estireno-divinilbenceno (Supelco-MCI GEL® CHP20P) para la preparación de biocatalizadores inmovilizados de lipasas.
- Comparación de las propiedades de los catalizadores obtenidos con otros biocatalizadores de la misma enzima en términos de estabilidad térmica y estabilidad en disolventes, actividad en reacciones de hidrólisis y especificidad con diferentes sustratos.
- Utilización de los nuevos biocatalizadores en la producción de biodiesel y comparación con biocatalizadores comerciales de la misma enzima.
- Análisis de los biocatalizadores comerciales de las diferentes lipasas en reacciones de esterificación para producir ésteres aromáticos en medio anhidro.
- Estudio comparativo de los nuevos biocatalizadores y los biocatalizadores comerciales en reacciones de esterificación.
- Efecto de la tecnología de ultrasonidos en reacciones de esterificación catalizadas por diferentes biocatalizadores de lipasas.

4 MATERIALES

Enzimas y biocatalizadores comerciales.- Todas las enzimas utilizadas y los biocatalizadores comerciales fueron donados por Novozymes, España.

Se utilizaron cuatro lipasas suministradas como disoluciones enzimáticas: lipase CalB (lipasa B de *Candida antarctica*), lipozyme® TL 100 L (lipasa de *Thermomices languniosa*), Palatase® 20000 L (*Rhizomucor miehei*), y Lecitase® Ultra (una fosfolipasa artificial comercial sintetizada en *Aspergillus oryzae*).

Los biocatalizadores comerciales utilizados fueron, Novozymes 435 (CalB inmovilizada en una resina macroporosa), lipozyme® TL IM (biocatalizador de lipozyme® TL 100 L inmovilizada en un soporte de silicato), y lipozyme® RM IM (Palatase® 20000 L inmovilizada en una resina de intercambio iónico).

Para simplificar, las enzimas y los biocatalizadores comerciales se nombrarán en el resto del texto de manera abreviada, CalB (lipase CalB), TLL (lipozyme® TL 100 L), LU (Lecitase® Ultra), RML (Palatase® 20000 L), Novo435 (Novozymes 435), TL-IM (lipozyme® TL IM), y RML-IM (lipozyme® RM IM).

Soportes.- Se usaron soportes comerciales formados por partículas porosas de poliestireno-divinilbenceno (Diaion® HP20LX, y Supelco-MCI GEL® CHP20P), y un soporte de resina de poliácrlato con su superficie modificada con grupos decaoctil (decaoctyl Sepabeads).

Diaion® HP20LX y el soporte decaoctyl Sepabeads fueron obtenidos de la casa Residión srl, y el soporte Supelco-MCI GEL® CHP20P, de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

Se utilizó también como soporte, Octyl-Sepharose® 4BCL, que consiste en una matriz de agarosa entrecruzada al 4% con grupos octil unidos covalentemente; éste se obtuvo del proveedor, GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

Estos soportes se nombrarán en lo sucesivo como, Diaion (Diaion® HP20LX), C18 (decaoctil Sepabeads), MCI (Supelco-MCI GEL® CHP20P), y octyl (Octyl-Sepharose® 4BCL).

Reactivos.- Los siguientes reactivos se obtuvieron de la casa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos):

los sustratos, triacetina, diacetina, p-nitrofenil butirato (p-NPB), α -hidroxifenilacetato de metilo (D,L-mandelato de metilo), hexanoato de etilo, fenilacetato de metilo; y los ácidos y alcoholes utilizados en las reacciones de esterificación: etanol, i- propanol, 1-pentanol, 2-pentanol, i-butanol, ácido acético, ácido propanoico, ácido butírico.

Disolventes orgánicos, como el acetonitrilo, y el n-hexano, y el detergente docedil-sulfato de sodio (SDS).

Reactivos para la preparación de tampones, como el acetato de sodio, fosfato de sodio (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4), y el tampón trizma-base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol).

El aceite de soja refinado fue obtenido de un mercado local (Porto Alegre, Brasil)

Reactivos como el metanol y otros utilizados fueron de grado analítico.

Para determinar la cantidad de proteína en las disoluciones de enzima comercial se usó la preparación “Coomassie Bradford assay kit” obtenida de la casa Thermo Scientific, España.

Los reactivos para llevar a cabo la electroforesis, preparación de geles de poliacrilamida, el patrón de peso molecular (LMW, 14-97kDa), β -mercaptoetanol, fueron obtenidos de la casa, GE Healthcare (Uppsala, Suecia).

5 MÉTODOS

5.1 Preparación de biocatalizadores en soportes hidrofóbicos.

5.1.1 Medida de la concentración de proteína en disoluciones enzimáticas.

Para determinar la masa de proteína contenida en las disoluciones enzimáticas, se utilizó el método Bradford (Bradford, 1976) utilizando como patrón de referencia una preparación de proteína de suero bovino.

5.1.2 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Las electroforesis se realizaron de acuerdo con el método descrito por Laemmli (Laemmli 1970), utilizando una unidad Mini-Protean 3 de Bio-Rad (Hercules, CA, EEUU). Los geles (9 x 6cm) se prepararon con una concentración de poliacrilamida del 12 o del 15% en la zona de separación, y del 5% de poliacrilamida en la zona de concentración. Se tomaron muestras de 100mg de biocatalizador y se resuspendieron en 1ml del tampón de ruptura (2 % de dodecil-sulfato de sodio, SDS, 5 % de β -mercaptoetanol, 10 % de glicerol, 0,005 % de azul de bromofenol en Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8). Las muestras se colocaron en un recipiente con agua hirviendo y se dejaron durante 5 minutos.

Cuando se mide la enzima inmovilizada en un soporte se toma el sobrenadante para ser sembrado en los geles, después de centrifugar las muestras hervidas. Se inyectaron hasta 20 μ l de muestra en los geles y los patrones de bajo peso molecular. Para ejecutar la separación se aplicó un voltaje continuo de 150V. Al finalizar la separación los geles fueron teñidos con azul brillante de Coomassie.

5.1.3 Medida estándar de la actividad enzimática.

Las medidas de actividad se llevaron a cabo en un espectrofotómetro UV-visible (Spectriphotometer Suimadzu UV-1603) con agitación continua y celda acoplada a un baño termostático (J P Selecta tectron bio), y. Se determinó el incremento de absorbancia medida a una longitud de onda de 348nm en la hidrólisis de una disolución 0.4mM de p-NPB. Se colocaron 2.5ml de tampón fosfato de sodio 100mM pH7, y se añadió entre 20 y 200 μ l de disolución enzimática diluida en tampón fosfato de sodio 5mM a pH 7. Se define la unidad internacional de actividad

enzimática (U , [$\mu\text{mol}/\text{min}$]) como la cantidad de enzima capaz de hidrolizar $1 \mu\text{mol}$ de sustrato por minuto, en las condiciones de análisis, pH 7 y 25°C .

A continuación, en las ecuaciones [1] y [2] se especifica cómo se calcularon la actividad enzimática y la actividad específica:

$$\frac{U}{\text{ml}} = (\Delta Abs_{enzima} - \Delta Abs_{pNPB})_{348\text{nm}} \cdot \frac{V_{total\ en\ cubeta}}{V_{enzima}} \cdot \frac{1}{\epsilon_{348\text{nm}}} \cdot f_{dil} \quad [1]$$

$$\frac{U}{\text{mg}_{enzima}} = \frac{U}{\text{ml}} \cdot \frac{\text{ml}}{\text{mg}_{enzima}} \quad [2]$$

Donde,

$(\Delta Abs_{enzima} - \Delta Abs_{pNPB})_{348\text{nm}}$ es el incremento de la absorbancia con el tiempo medida a 348nm (punto isosbético), y calculada a partir de la cinética de la reacción, siendo la diferencia entre la respuesta obtenida de la muestra enzimática, y la respuesta medida para el sustrato, el p-NPB.

$V_{total\ en\ cubeta}$, volumen de reacción, es decir, la suma de los volúmenes de la disolución enzimática, el sustrato y el tampón.

V_{enzima} , volumen de la disolución enzimática añadido a la cubeta.

$\epsilon_{348\text{nm}}$, coeficiente de extinción molar del p-NPB, $5.15(\text{mM}\cdot\text{cm})^{-1}$

f_{dil} , factor de dilución de la enzima respecto a la disolución comercial disponible.

$\frac{\text{ml}}{\text{mg}_{enzima}}$, concentración enzimática de la disolución calculada por el método

Bradford (Bradford, 1976).

5.1.4 Preparación del soporte.

Dada su hidrofobicidad, los soportes han de ser hidratados antes de comenzar la inmovilización de las enzimas.

El soporte octyl, se preparó siguiendo las especificaciones del proveedor; lavando y filtrando al menos con 10 volúmenes de agua destilada para eliminar el etanol que le añade el fabricante para conservar el material.

Los soportes más hidrofóbicos, C18, Diaion y MCI fueron hidratados de manera más exhaustiva. Se tomaron 10g de soporte seco y se suspendieron en 100ml de acetonitrilo durante

1 hora bajo agitación. Pasada la hora se añadieron 100ml de agua destilada y se dejó de nuevo, en agitación, durante 1 hora. A continuación se eliminó el líquido por filtración, se resuspendieron los soportes en 100ml de agua destilada y se colocaron bajo agitación durante 1h. Después se lavaron de nuevo los soportes, filtrándolos con 5 volúmenes de agua destilada, y así poder ser almacenados a 4°C.

Los biocatalizadores comerciales fueron hidratados con agua destilada antes de ser usados en las reacciones en medio acuoso; para ello se pesaron 10g de biocatalizador comercial y se le añadió 100ml de agua destilada. Esta suspensión se colocó en un agitador de rodillos(Movil-Rod, JPSelecta®) durante 1h, y luego se eliminó el agua mediante filtración.

5.1.5 Inmovilización.

A pesar de que existen diferencias marcadas en la composición y propiedades físicas de los soportes utilizados, el tipo de inmovilización es en todos los casos por adsorción física mediante el fenómeno de activación interfacial de las lipasas.

La inmovilización se llevó a cabo preparando disoluciones de enzima con concentraciones entre 3 y 350 mg de proteína por g de soporte. Las disoluciones enzimáticas comerciales se diluyeron en tampón fosfato 5mM y pH7 en un factor de dilución 1/20. Estas suspensiones enzimáticas se colocaron en un agitador de rodillos(Movil-Rod, JPSelecta®) durante 30min antes de añadir el soporte. La inmovilización se llevó a cabo durante un máximo de 30h a 25°C.

Para hacer un seguimiento de la inmovilización se evaluó la actividad de sobrenadante y suspensión mediante la medida estándar de la actividad enzimática con p-NPB (punto 5.1.2). La inmovilización se consideró completa cuando la actividad del sobrenadante se redujo en más del 90% o no se apreciaron cambios en la actividad después de dos medidas consecutivas pasadas 4h. Una vez terminada la inmovilización, la mezcla fue filtrada y lavada con cinco volúmenes de agua destilada. La enzima inmovilizada o biocatalizador filtrado puede ser almacenado a 4°C hasta su uso.

5.1.6 Determinación de la capacidad de carga

La determinación de la capacidad persigue conocer la máxima cantidad de enzima que el soporte es capaz de albergar. Para estimar la capacidad de carga se prepararon diferentes muestras con distinta concentración de enzima y se siguió su inmovilización; se pesaron 2g húmedos de los soportes utilizados y se les añadieron 400ml de distintas disoluciones enzimáticas con concentraciones de 0.1 a 1mg_{enzima}/ml (preparadas mezclando la disolución enzimática comercial con tampón fosfato de sodio 5mM a pH7). El desarrollo de la inmovilización se llevo a cabo en un agitador de rodillos a 25°C, y se midió la actividad de los sobrenadantes periódicamente con p-NPB; se consideró finalizado el ensayo cuando no se observaron cambios en dos medidas consecutivas después de transcurrir entre ellas 4h.

5.1.7 Incubación en diferentes medios inactivantes.

Los biocatalizadores fueron sometidos al efecto de diferentes medios inactivantes para evaluar su estabilidad. Para ello, 1g de cada biocatalizador fue resuspendido en un volumen apropiado de tampón fosfato 10mM para obtener inicialmente un valor de absorbancia entre 0.1-0.2, valor confiable para la medida y el seguimiento de la actividad estándar (punto 5.1.2).

5.1.7.1 Estabilidad térmica.

Las muestras fueron sumergidas en un baño termostático (baño de control analógico de temperatura Tectron-Bio, JPSelecta®), y se extrajeron muestras periódicamente para medir la actividad estándar de la suspensión. Las condiciones de temperatura se ajustaron para que el curso de la inactivación fuese al menos de dos horas. En este periodo se obtuvo, a partir de los cursos de inactivación, el valor de la vida media o tiempo en el que la actividad disminuye al 50% de la medida inicialmente.

5.1.7.2 Incubación en acetonitrilo

La inactivación en disolvente orgánico se llevó a cabo incubando los biocatalizadores en disoluciones preparadas mezclando acetonitrilo en tampón Trizma-base 50mM pH7. Se ajustó la concentración de acetonitrilo para cada enzima, y se comprobó que el acetonitrilo no influye en la medida de la actividad con p-NPB. El curso de la inactivación fue estudiado al menos durante dos horas tomando muestras periódicamente.

5.1.7.3 Medida estándar de la actividad a diferentes valores de pH.

En este caso las muestras fueron resuspendidas en tampón fosfato 10mM a pH7; se siguió el protocolo de medida estándar de la actividad enzimática con la diferencia de que la medida en el espectrofotómetro se hizo a diferentes pHs, cambiando el pH del tampón de muestreo en la cubeta, con tampón 100mM con valores de pH entre 4 y 10. Se utilizó, tampón acetato de sodio, para pH 4, 5, y 6; tampón fosfato, para pH 7 y 8, y carbonato de sodio para pH 9 y 10.

5.1.8 Reacciones de hidrólisis con diferentes sustratos.

La medida de la actividad en la hidrólisis de los diferentes ésteres estudiados se realizó usando cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa, HPLC, (Spectra Physics SP 100, unido a un detector UV, Spectra Physics SP 8450) (Thermo, Santa Clara, CA, USA), con una columna Kromasil C18 (15cm \times 0.46cm) (Análisis Vínicos, SL). Todos los análisis se realizaron a 25°C. El tratamiento de los datos se realizó utilizando el programa BioCrom XP.

La actividad fue determinada con un grado de conversión de entre el 20 y el 30%.

En las figuras siguientes (Figura 1 y Figura 2) se muestran los sustratos utilizados en las reacciones de hidrólisis.

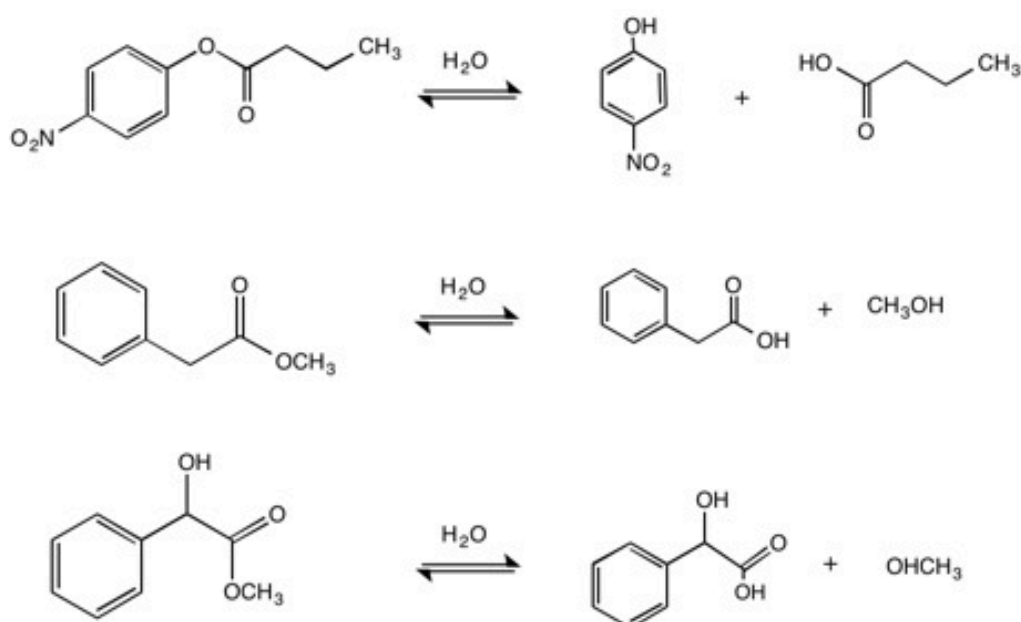


Figura 1. Sustratos aromáticos utilizados en las reacciones de hidrólisis catalizadas por los biocatalizadores estudiados.

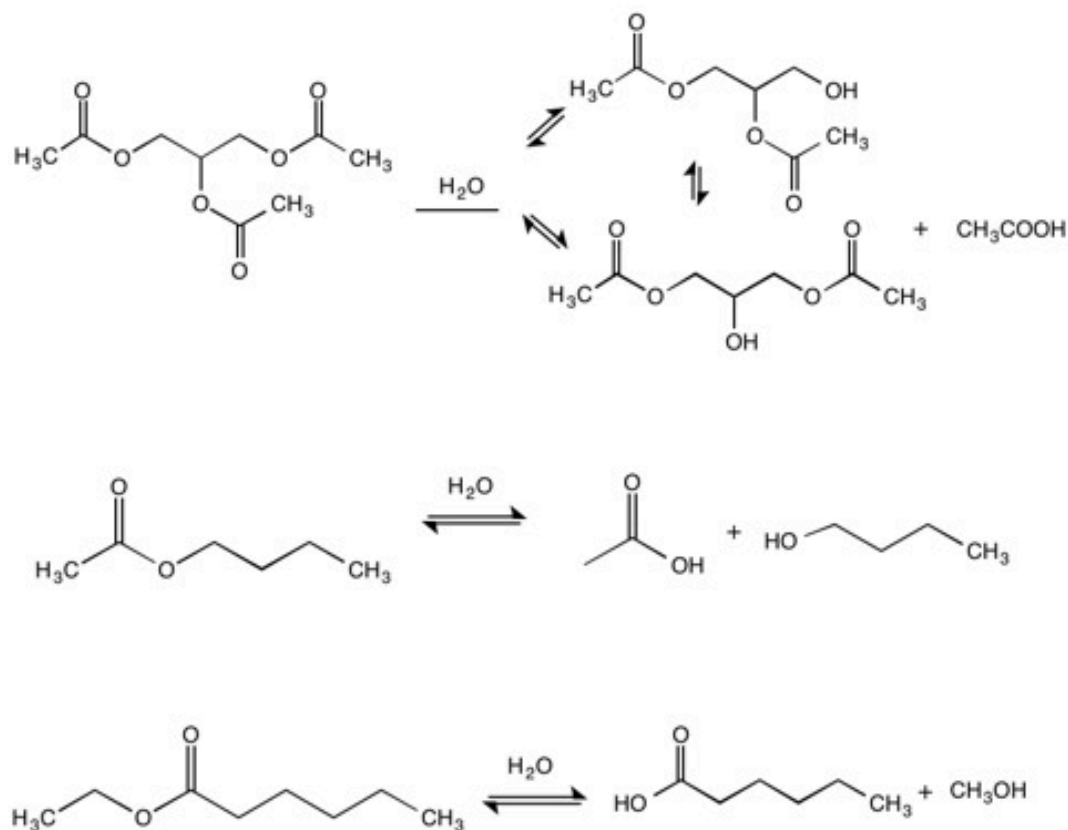


Figura 2. Substratos alifáticos utilizados en las reacciones de hidrólisis catalizadas por los biocatalizadores estudiados.

5.1.8.1 D,L-mandelato de metilo (α -hidroxifenilacetato de metilo).

El sustrato, D,L-mandelato de metilo, se preparó con una concentración de 50mM utilizando como disolventes disoluciones de acetato de sodio 50mM, para pH5, y tampón fosfato de sodio 50mM, para pH7 y 8.5. Se pesaron muestras con una masa mínima de 200mg y se les añadió 1ml del sustrato. Las muestras fueron colocadas en un agitador de rodillos a 25°C. Se extrajeron muestras de la suspensión y luego fueron centrifugadas para obtener el sobrenadante que se separó para ser analizado. Se utilizó como fase móvil una disolución 10mM de acetato de amonio, con relación volumétrica de agua:acetonitrilo de 65:35 y pH2.8. Se mantuvo un flujo constante de 1ml/min, y el volumen de inyección fueron 20 μL . El detector UV operó a 230nm, siendo los volúmenes de retención de para el ácido mandélico 2.4ml, y para el mandelato de metilo 4.2ml.

En este caso se define la unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 μmol de ácido mandélico por minuto, en las condiciones descritas.

5.1.8.2 Hexanoato de etilo.

Para preparar el sustrato se mezcló el hexanoato de etilo en acetonitrilo (50% en volumen) y tampón 50mM, a pH5, acetato de sodio, y tampón fosfato para pH7 y 8.5; siendo la concentración final del hexanoato de etilo de 25mM; se prepararon muestras pesando al menos 200mg de biocatalizador y un volumen de 0.6ml de sustrato, las muestras se colocaron en un agitador de rodillos a 25°C. Las muestras se extrajeron periódicamente y fueron centrifugadas para analizar el sobrenadante. El volumen de muestra inyectado en el HPLC fue de 20µL, que fueron eluidos en la fase móvil a 1ml/min. La fase móvil consistió en una disolución 10mM de acetato de amonio, en una disolución de relación volumétrica en agua:acetonitrilo, 50:50, y pH3.2. La detección de los compuestos se realizó a 208nm, siendo 14.2ml, el volumen de retención del éster, hexanoato de etilo), y el del ácido, ácido hexanoico, 3.4ml.

La unidad de actividad enzimática se define, en las condiciones descritas, como la cantidad de enzima necesaria para producir 1µmol de ácido hexanoico por minuto.

5.1.8.3 Fenilacetato de metilo.

Este sustrato fue preparado en una concentración de 5mM, en tampón 50mM (acetato de sodio a pH5, y tampón fosfato para pH7 y 8.5) y 50% de acetonitrilo. Se pesaron al menos 200mg de biocatalizador y añadieron 0.6ml de sustrato. Las muestras se mantuvieron en agitación continua y se fueron extrayendo muestras en diferentes tiempos.

La fase móvil fue una disolución 10mM de acetato de amonio, disuelto en un volumen 50:50, agua:acetonitrilo a pH2.8. Se inyectaron 20µL y se midió en el HPLC a 25°C, con una longitud de onda de detección de 230nm. En estas condiciones, el volumen de retención del fenilacetato de metilo fue 12.5ml y el del ácido 4.2ml.

Las unidades de actividad enzimática fueron definidas como la cantidad de enzima necesaria para producir 1µmol de ácido fenilacético en las condiciones descritas.

5.1.8.4 Acetato de butilo.

Las muestras se prepararon pesando 20mg de biocatalizador en 20ml de sustrato. El sustrato se preparó en tampón fosfato de sodio 100mM pH7, con una concentración final de 50mM en acetato de butilo.

El análisis de la hidrólisis del acetato de butilo se llevó a cabo utilizando una fase móvil compuesta por una disolución 50% en acetonitrilo, 50% agua, con un caudal de 1.5ml/min, una inyección de la muestra de 20 μ L, y la detección de los compuestos a 230nm.

Las unidades de actividad enzimática están definidas como la cantidad de enzima necesaria para producir un 1 μ mol de ácido acético por minuto en las condiciones descritas.

5.1.8.5 Triacetina.

Se preparó una disolución 100mM de triacetina en tampón fosfato de sodio 1M a pH5, condiciones en las que la triacetina es totalmente soluble en el tampón. Las muestras se prepararon pesando 1g de los biocatalizadores y añadiendo 50ml de sustrato; la mezcla se colocó en un agitador de rodillos a 25°C. Se extrajeron muestras periódicamente y se separó el sobrenadante de la reacción mediante centrifugación. Este sobrenadante se inyectó en el sistema de HPLC (20 μ L), utilizando una fase móvil con una composición volumétrica del 10% de acetonitrilo en agua. Todas las mediciones se realizaron a 25°C, a un caudal de 1ml/min, con una longitud de onda de detección de 230nm. Los volúmenes de retención de las sustancias analizadas fueron, 32ml para la triacetina, 5.8ml para la 1,2diacetina.

Las concentraciones de triacetina y diacetina fueron calculadas utilizando curvas de calibrado.

5.2 Reacciones de medio orgánico.

Para trabajar en medio orgánico y anhidro, los biocatalizadores se secaron antes de su utilización; colocando en una placa Petri una cantidad adecuada del biocatalizador y dejándolo secar durante al menos 8 horas en un horno a 37°C.

5.2.1 Transesterificación: producción de biodiesel

Esta reacción se llevo a cabo a partir de aceite de soja y metanol en presencia del biocatalizador.

La reacción de transesterificación se llevó a cabo en frascos Erlenmeyer de 50ml, pesando 1g del aceite de soja y considerando como variables, las cantidades de metanol, agua y biocatalizador; Las muestras fueron colocadas, en un baño metabólico con agitación mecánica, Marconi (modelo Dubnoff MA 93, Brasil), a 30°C y 200rpm.

El análisis del avance de la reacción se llevó a cabo por cromatografía de gases; hasta completarse la reacción (después de alrededor de las 72h), se extrajeron muestras, tomando 5ml del volumen de reacción, que fue centrifugado (2500xg, 7min, 4°C) y separado el sobrenadante donde se concentran los ésteres. El análisis de los ésteres se realizó mediante cromatografía de gases (Shimadzu, GC-14B, Brasil) en un equipo provisto de un detector de ionización de llama (FID) y una columna de capilaridad (Supelco, SLB-IL100, Sigma-Aldrich, Brasil) 30mx0.25mm idx0.20mM. La temperatura de inyector y la del detector fueron 250°C, una “Split ratio” de 50:1; el gas portador fue hidrógeno a un flujo de 40cm·s⁻¹. Las condiciones de la columna fueron 100°C, tasa de calentamiento de 3°C·min⁻¹, hasta alcanzar una temperatura final del 250°C.

Se utilizó como patrón interno hidroxitolueno butilado (0.4mg·ml⁻¹), y se inyectó 1ml de muestra. El tiempo de análisis fue de 60min.

La conversión fue calculada de acuerdo con la norma EN 14103 a partir de la cantidad producida de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) .

5.2.2 Reacciones de esterificación: producción de aromas.

En este grupo de experimentos se llevaron a cabo reacciones de esterificación con los biocatalizadores en medio orgánico (n-hexano); se utilizaron distintas combinaciones de ácidos y alcoholes, y se evaluaron diferentes variables que afectan al rendimiento de la reacción.

5.2.2.1 Medida del avance de la reacción de esterificación por titración.

En frascos Erlenmeyer de 50ml se prepararon las muestras con un volumen de reacción de 10ml, en el que se añadió el sustrato (el ácido y alcohol), y el medio de reacción orgánico, n-hexano. Se pesó la cantidad de biocatalizador necesario, y las muestras se colocaron en baños con temperatura controlada, y agitación.

Se utilizaron dos mecanismos de agitación; agitación mecánica mecánica a 200rpm, en un baño metabólico, Marconi (modelo Dubnoff MA 93, Brasil) ; y agitación por ultrasonidos, en un baño ultrasónico, Ultrasonic Cleaner de la empresa Unique (USC 2880A, 40kHz, 220W, Brasil).

Cada media hora o una hora, se extrajeron muestras para evaluar por titración el avance de reacción midiendo el consumo de ácido en el medio. La toma de muestra se llevó a cabo pesando 0.3 g de sobrenadante, al que se añadieron 5ml de alcohol etílico, para diluir y parar la reacción.

Como indicador se utilizó fenoftaleína y como agente de titración, hidróxido de sodio en diferentes concentraciones, en función de la concentración de sustrato en la muestra.

Para comprobar la certidumbre de las medidas se elaboraron curvas de calibrado a partir de disoluciones preparadas en el laboratorio de las mezclas de los reactivos, ácido, alcohol y éster sintetizado.

Para contrastar los resultados obtenidos por titración, para ciertas medidas, se analizaron los ésteres formados en la reacción por cromatografía de gases. Para ello se utilizó un equipo

GC-2010 Plus (Shimadzu, Tokio) provisto de un detector de ionización de llama (FID) y una columna AT.FFAP (para análisis de ácidos libres, “free fatty acid phase”), de dimensiones, 30 m x 0.32 mm x 0.25 μm . El gas portador fue nitrógeno, y la temperatura de inyector y la del detector fueron ambas 250°C; una “Split ratio” de 1:10. El horno fue programado para comenzar a una temperatura de 60 °C, 10 °C min⁻¹ hasta 90 °C, 30 °C min⁻¹ hasta 240 °C, y finalmente se mantuvo a 240 °C durante 2.5 min.

5.2.2.2 Optimización de las condiciones de reacción.

Conocida la reacción esterificación enzimática para la producción de ésteres de aroma, dados los datos bibliográficos y las experiencias anteriores, se establecieron las variables objeto de estudio, en un rango de valores probables. Las principales variables estudiadas fueron, la temperatura, la relación molar del sustrato (es decir, la relación entre el alcohol y el ácido), el contenido inicial de agua añadido, y la cantidad de biocatalizador añadida.

5.2.2.2.1 Análisis independiente de variables.

El estudio de las variables se realizó de manera independiente. Se buscó maximizar el rendimiento de la esterificación. El valor óptimo de cada variable se utilizó para obtener el óptimo de la siguiente variable estudiada.

5.2.2.2.2 Análisis mediante diseño experimental: metodología de superficie de respuesta y diseños compuestos centrales.

La organización de los experimentos para la optimización de las condiciones de transesterificación y esterificación se realizó siguiendo la metodología del diseño experimental mediante las superficies de respuesta. Estas técnicas matemáticas y estadísticas permiten conocer

no sólo los efectos de las variables de manera individual, sino también las interacciones entre dos o más variables.

Se utilizaron modelos de segundo orden, usando diseños compuestos centrales (ecuación [3]). Sabiendo que k , es el número de variables estudiadas, los diseños compuestos centrales consisten en, 2^k diseños factoriales, $2 \cdot k$ diseños axiales, y n_o , repeticiones del punto central. Estos últimos, los experimentos en el punto central, n_o , dan una idea del error de la experimentación, y su número puede variar.

La variable dependiente estudiada (Y) fue el rendimiento de la reacción, en las reacciones de esterificación, o la velocidad inicial de reacción en el caso de la reacción de transesterificación.

Se consideraron un máximo de cuatro variables, $x_1 \dots x_j$: la temperatura, la relación molar del substrato (alcohol:ácido, o alcohol:aceite), la cantidad de biocatalizador utilizada, y el contenido inicial de agua añadido. Para estas cuatro variables se tendría un diseño con 16 ensayos correspondientes al diseño factorial, 8 experimentos en los ejes o axiales, y los n_o experimentos en el punto central.

$$Y = \beta_o + \sum_{i=1}^k \beta_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^k \beta_{ij} \cdot X_i \cdot X_j \quad [3]$$

En la ecuación [3] se distingue, la variable dependiente o respuesta, Y ; es decir, el % del rendimiento de la esterificación; X_i , X_j , los valores codificados de las variables independientes, $x_i \dots x_j$. El parámetro β_o es constante, y los coeficientes β_i , β_{ii} , β_{ij} , son los parámetros para la evaluación de los efectos de la variable sobre la respuesta, de tipo lineal, cuadrático y los efectos de las interacciones entre variables, respectivamente.

En el diseño experimental y el análisis de los datos se utilizó el programa Statistica 7.0 (Statsoft, EEUU). Para el estudio estadístico del modelo obtenido se realizaron análisis de varianza (ANOVA). El grado de significación de los coeficientes de regresión y las probabilidades asociadas se determinaron utilizando el test de la t de Student.

5.2.2.3 Reutilización de los biocatalizadores

Una vez establecidas las condiciones óptimas de operación, los biocatalizadores se sometieron a varios ciclos de operación. Después de llevar a cabo la reacción de esterificación, el

biocatalizador fue separado del medio de reacción mediante filtrado a vacío y lavado o no (según se indique), con n-hexano. Por último, antes de su nuevo uso, se dejó secar toda la noche a 37°C.

6 RESULTADOS.

6.1 Preparación de biocatalizadores en soportes hidrofóbicos.

En este apartado se recogen los resultados más relevantes obtenidos en la preparación de los biocatalizadores; se presentan los datos de la observación del curso de la inmovilización en los diferentes soportes hidrofóbicos y la obtención de la capacidad de carga de cada biocatalizador; se estudió la estabilidad de los biocatalizadores preparados por acción de diferentes medios inactivantes. Se observará también el efecto de la inmovilización de las enzimas en su especificidad en reacciones de hidrólisis con diferentes sustratos.

Se prepararon los siguientes biocatalizadores clasificados por enzima:

- Biocatalizadores de CalB: CalB-MCI, CalB-Diaion, CalB-C18.
- Biocatalizadores de TLL: TLL-MCI, TLL-octyl.
- Biocatalizadores de RML: RML-MCI, RML-octyl.
- Biocatalizadores de Lecitasa: Le-MCI, Le-octyl.

Además de estos, se utilizaron los siguientes biocatalizadores comerciales para ser comparados con los preparados:

- Biocatalizador comercial de CalB: Novo435.
- Biocatalizador comercial de TLL: TL-IM.
- Biocatalizador comercial de RML: RM-IM.

6.1.1 Biocatalizadores de CalB.

6.1.1.1 Inmovilización y capacidad de carga

La preparación de los biocatalizadores comenzó con la inmovilización de CalB, una de las lipasas más estudiadas y utilizadas en biocatálisis (Hernández K. 2011). Como se indicó anteriormente, para esta enzima se estudiaron los siguientes biocatalizadores, CalB-MCI, CalB-Diaion, CalB-C18, y el biocatalizador comercial Novo435.

La Figura 3 muestra el curso de la inmovilización de la enzima CalB en los soportes MCI, Diaion y C18.

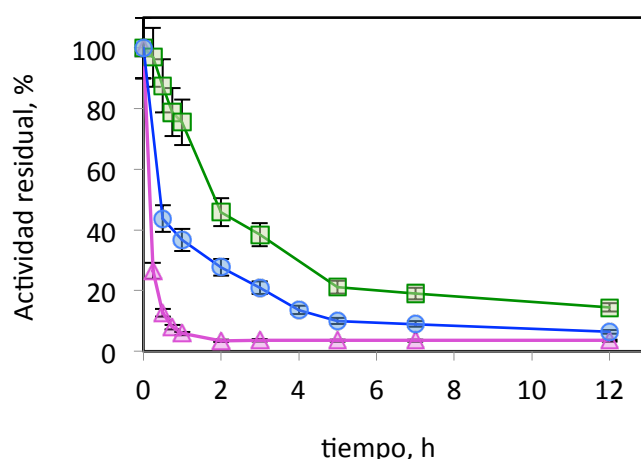


Figura 3. Curso de inmovilización de la enzima CalB en los soportes C18 (cuadrados), Diaion (círculos) y MCI (triángulos). La inmovilización se llevó a cabo pesando 1g de soporte al que se le añadió 40ml de una disolución 0.5mg/ml de CalB en tampón fosfato 5mM pH7. La actividad residual se refiere a la actividad medida en el sobrenadante respecto a la actividad inicial de la disolución enzimática.

A partir de los ensayos para la determinación de la capacidad de carga de CalB en los diferentes soportes, se obtuvieron los resultados mostrados en la Tabla 1.

Tabla 1. Resultados del ensayo para determinar la capacidad de carga de la lipasa CalB en los soportes hidrofóbicos, MCI, C18 y Diaion.

mg _{enzima} /g _{soporte}	MCI	Diaion	C18
CalB	113 ± 10	41 ± 3	48 ± 4

6.1.1.2 Evaluación de la actividad frente a agentes inactivantes.

En este apartado se recogen los resultados de la incubación de los biocatalizadores de CalB en diferentes medios inactivantes, como la temperatura, el pH y la incubación en un medio orgánico como es una disolución de acetonitrilo.

6.1.1.2.1 Estabilidad térmica

Los biocatalizadores preparados, MCI-CalB, Diaion-CalB, y C18-CalB, y el biocatalizador comercial, Novo435, fueron incubados en un baño a 60°C; el curso de la inactivación térmica fue seguido midiendo la actividad de la suspensión mediante el ensayo estándar con p-NPB (sección 5.1.3). Los resultados se muestran representados en la Figura 4.

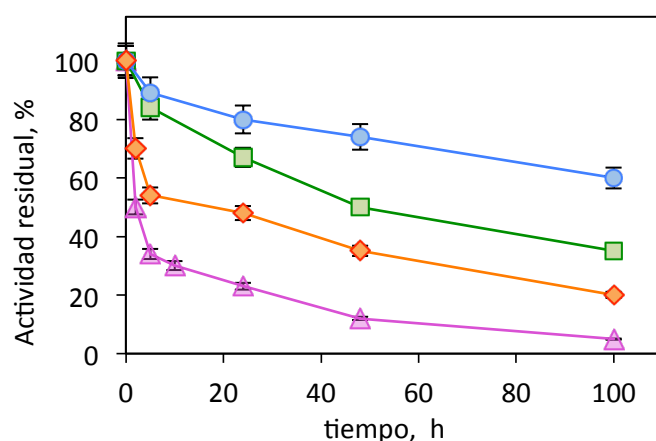


Figura 4. Inactivación térmica. Los biocatalizadores fueron incubados a 60°C. Se pesó 1g de cada biocatalizador, preparados con 20mg_{enzima}/g; estos fueron suspendidos en 20ml de tampón fosfato de sodio 10mM a pH7. Se extrajeron muestras periódicamente y se midió la actividad mediante el ensayo estándar de actividad con p-NPB. El porcentaje de actividad residual se refiere a la relación entre la actividad en el momento de medida y la actividad inicial del biocatalizador. CalB-Diaion (cuadrados), CalB-MCI (triángulos), CalB-C18(círculos), Novo435(rombos).

6.1.1.2.2 Incubación en acetonitrilo.

Los biocatalizadores de CalB fueron incubados en una disolución 50% de acetonitrilo en tampón Trizma-base 50mM pH7, el curso de la inactivación se muestra en la Figura 5.

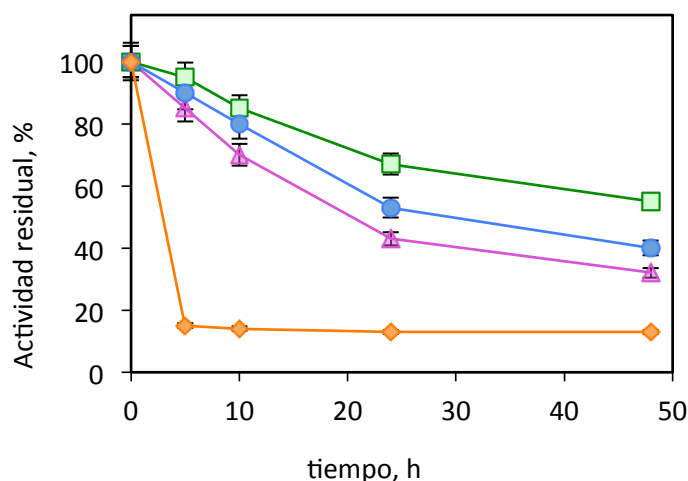


Figura 5. Inactivación de los biocatalizadores de CalB cuando fueron incubados en una disolución al 50% de acetonitrilo en tampón Trizma-base 50mM pH7. Los biocatalizadores se prepararon con una carga enzimática de 20mg/g y se compararon con el biocatalizador comercial Novo435. El seguimiento de la actividad se realizó por medida estándar de la actividad con p-NPB. CalB-Diaion (cuadrados), CalB-MCI (triángulos), CalB-C18(círculos), Novo435(rombos).

6.1.1.3 Efecto de la inmovilización de CalB en su actividad y especificidad.

Para evaluar el efecto de la inmovilización de la enzima CalB en su actividad y especificidad, se analizaron mediante HPLC diferentes reacciones de hidrólisis; para ello se utilizaron como sustratos, el D,L-mandelato de metilo, el acetato de butilo, y la triacetina (detalles en sección 5.1.8).

Para evitar los efectos del posible impedimento difusional debido al tamaño de partícula de los diferentes soportes, se prepararon biocatalizadores con carga enzimática de 2, 10 y 20mg_{enzima}/g_{soporte}; no se observaron diferencias significativas entre las muestras con diferentes cargas. La variación en los datos de actividad mostradas para cada sustrato en las siguientes tablas (Tabla 2 y Tabla 3), se mantuvieron independientemente de la carga enzimática de la muestra analizada.

En la Tabla 2 se muestran las actividades específicas, IU/mg_{enzima} de los diferentes biocatalizadores. Las unidades enzimáticas (IU) se refieren a la cantidad de enzima necesaria para producir un μ mol de producto por minuto.

Para comparar los biocatalizadores preparados con el biocatalizador comercial, Novo435, se muestra la Tabla 3, donde se especifica la actividad a máxima capacidad de carga (valores presentados en la Tabla 1, detalles en la sección 0).

Tabla 2. Actividad específica de la hidrólisis de los diferentes biocatalizadores con los tres sustratos analizados. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a pH7 y 25°C.

IU/mg _{CalB}	MCI	Diaion	C18
D,L-Mandelato de metilo	2.5	1.5	0.85
Acetato de Butilo	81	50	68
Triacetina	2.5	1.5	2.1

Tabla 3. Actividad de los biocatalizadores preparados y el biocatalizador comercial, Novo435, para los tres sustratos estudiados.

IU/g _{biocatalizador}	MCI	Diaion	C18	Novo435
D,L-Mandelato de metilo	265	55	45	37
Acetato de Butilo	8250	2000	3250	1100
Triacetina	270	60	105	75

6.1.2 Biocatalizadores de TLL, RML y Lecitasa.

La lipasa TLL se ha utilizado en la industria alimentaria, en la producción de biodiesel y en química fina (Fernández-Lafuente 2010, Rodrigues R.C. y col. 2011). Junto con la producción de biodiesel, la lipasa RML, tiene otras aplicaciones desarrolladas en diferentes campos, entre ellos la producción de sabores alimentarios y aromas para la industria alimentaria y la producción de fragancias (Rodrigues R.C. y col. 2010a). La enzima Lecitase® Ultra, a pesar de ser una fosfolipasa, es también capaz de inmovilizarse por activación interfacial a soportes hidrofóbicos como ocurre en las lipasas. Ésta ha sido obtenida al fusionar genes de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* y la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum*. Se ha utilizado para aumentar el rendimiento en el proceso de eliminación de las gomas presentes como impurezas en los aceites usados, por ejemplo, para la producción de biodiesel (Fernández-Lorente G. y col. 2007b).

Estas enzimas se inmovilizaron via activación interfacial en dos soportes hidrofóbicos diferentes, obteniendo los biocatalizadores, TLL-MCI, TLL-octyl, RML-MCI, RML-octyl, Le-MCI, y Le-octyl estos serán caracterizados en cuanto a su estabilidad y se estudiará su especificidad en diferentes reacciones de hidrólisis junto con el biocatalizador comercial correspondiente, si está disponible.

6.1.2.1 Inmovilización y capacidad de carga

En la Figura 6 se muestra el curso de la inmovilización de las enzimas en los soportes MCI y octyl. La capacidad de carga de los biocatalizadores se recogió en la Tabla 4.

Tabla 4. Capacidad de carga de las enzimas TLL, RML y Lecitasa en los soportes hidrofóbicos, octyl y MCI. Su determinación se llevó a cabo según lo descrito en la sección 0.

$\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{soporte}}$	MCI	Octyl
TLL	90 ± 8	20 ± 2
RML	310 ± 20	11 ± 2
Lecitasa	180 ± 15	30 ± 3

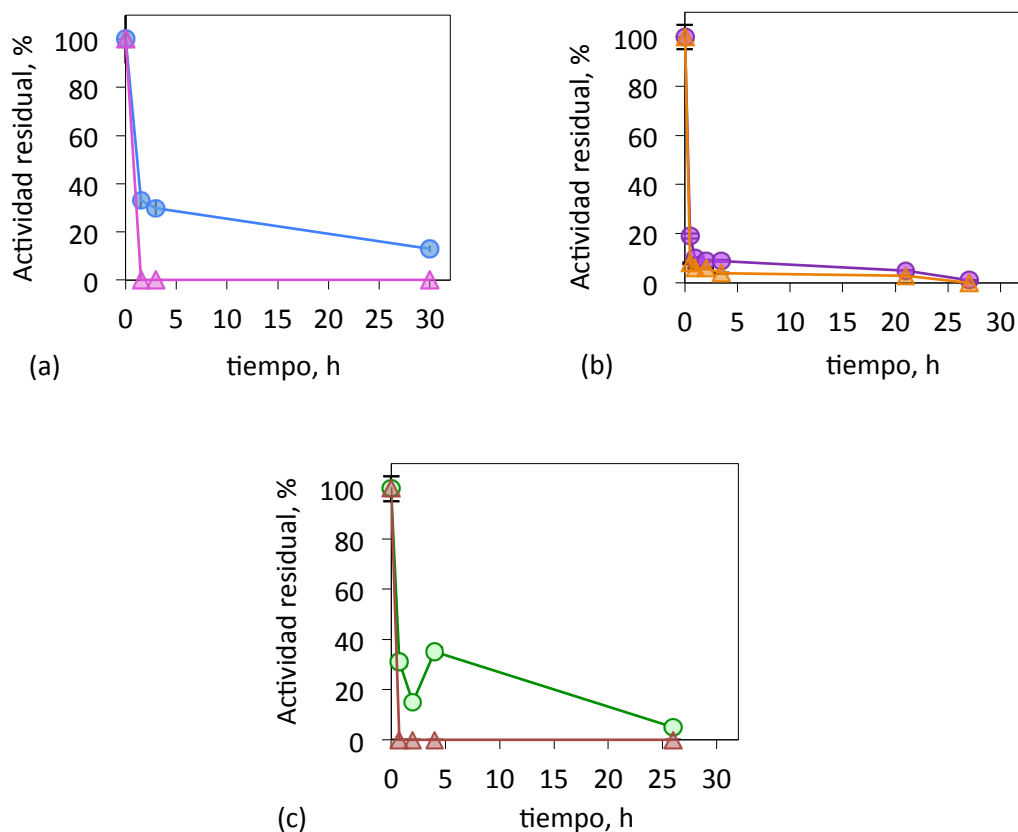


Figura 6. Inmovilización de las enzimas TLL(a), RML(b) y Lecitasa(c) en los soportes octyl (círculos) y MCI (triángulos) a 25°C. Se prepararon muestras en las que se ofrecieron 3mg de enzima por g de soporte; la actividad se midió con p-NPB. La actividad residual se refiere a la comparación de la actividad del sobrenadante en cada punto, con la actividad de la disolución enzimática ofrecida en la inmovilización.

6.1.2.2 Evaluación de la actividad frente a agentes inactivantes.

6.1.2.2.1 Estabilidad térmica.

Los biocatalizadores preparados de las enzimas fueron incubados a una temperatura indicada, 45°C, para TLL y RML, y 50°C para lecitasa. Se resuspendió 1g de cada biocatalizador en 5ml de tampón 10mM, a diferentes pH; tampón acetato para pH 5, y fosfato para pH 7 y 8.5. A partir del curso de la incubación se obtuvieron los valores de la vida media, es decir, el tiempo en el que la actividad de la suspensión ha disminuido el 50% con respecto al valor inicial. Estos valores se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Vidas medias de los biocatalizadores de la enzima TLL, RML y Lecitasa a diferentes valores de pH cuando fueron incubados en baños termostático a 45°C (TLL y RML), y 50°C (lecitasa). La actividad en la suspensión fue medida periódicamente con p-NPB y comparada con la actividad inicial. *El biocatalizador TLL-octyl conservó el 90% de la actividad después de 10h de incubación a 45°C.

Vida media(min)/pH	5	7	8.5
TLL-MCI	23	20	23
TLL-Octyl	>90%*	>90%*	>90%*
RML-MCI	180	105	30
RML-Octyl	1800	750	26
Le-MCI	30	45	24
Le-Octyl	510	900	30

6.1.2.2.2 Incubación en acetonitrilo.

Los biocatalizadores de las enzimas TLL, RML y Lecitasa fueron incubados en disoluciones de tampón Trizma-base 50mM pH7 con diferentes concentraciones de acetonitrilo; los cursos de la incubación se muestran en la Figura 7.

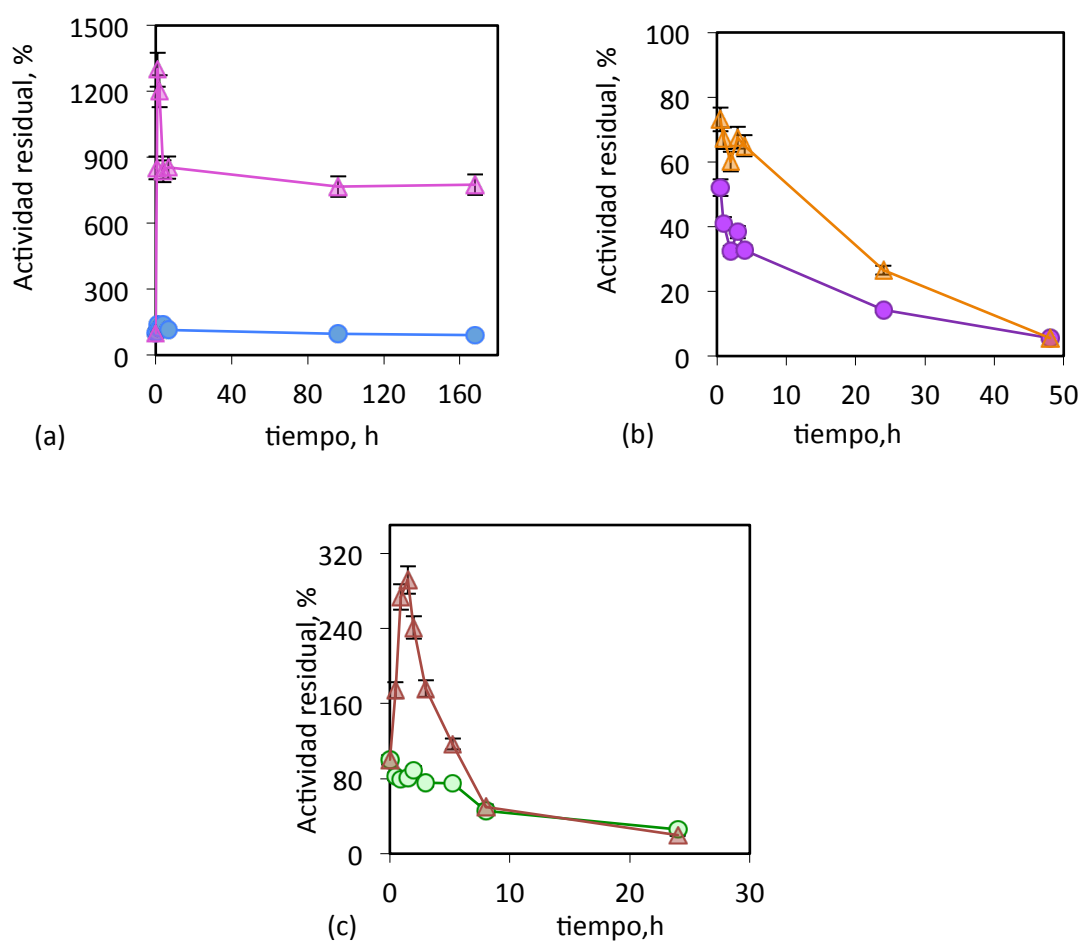


Figura 7. Efecto de la incubación en acetonitrilo de los biocatalizadores de las lipasas TLL(a), RML(b), y Lecitasa(c) inmovilizados en los soportes MCI (triángulos) y octyl (círculos), en una disoluciones con 80% (TLL), y 30% (RML y Lecitasa) (v/v) de acetonitrilo en tampón Trizma-base 50mM pH7. La incubación de los biocatalizadores, con una carga enzimática de 3mg/g, se realizó a 25°C.

6.1.2.2.3 Medida de la actividad a diferentes valores de pH.

La actividad frente a p-NPB de las suspensiones de los biocatalizadores, con una carga enzimática de 3mg/g, fueron medidas a diferentes valores de pH; los diferentes valores de la actividad específica se agrupan en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto del pH en la actividad de los biocatalizadores frente a p-NPB. Los biocatalizadores de TLL, RML y Lecitasa con carga enzimática de 3mg/g, fueron resuspendidos en tampón fosfato 10mM pH7 y se midió la actividad a diferentes pH. La actividad específica está definida como la cantidad de producto (μmol) obtenido por minuto y mg de enzima inmovilizada.

IU/mg _{enzima} pH	5	6	7	8	9	10
Le-MCI	0.16	0.50	0.42	0.37	0.36	0.45
Le-Octyl	10.5	13	11.5	16.5	16.8	28
RML-MCI	0.45	0.45	0.50	0.47	0.33	0.02
RML-Octyl	9.7	11.2	12.1	10.2	6.4	1.3
Le-MCI	0.16	0.50	0.42	0.37	0.36	0.45
Le-Octyl	10.5	13	11.5	16.5	16.8	28

6.1.2.3 Efecto de la inmovilización de las enzimas en su actividad y especificidad.

Los biocatalizadores preparados y los biocatalizadores comerciales se evaluaron en reacciones de hidrólisis a diferentes valores de pH; se utilizaron tres sustratos que presentan diferentes propiedades en cuanto al tamaño, el carácter alifático o aromático, y la polaridad (Figura 1 y Figura 2). Los resultados se recogieron en la Tabla 7, los detalles de la experimentación se describieron en la sección 5.1.8.

Tabla 7. Actividad específica de los biocatalizadores a diferentes valores de pH en reacciones de hidrólisis de los ésteres, D,L-mandelato de metilo, hexanoato de etilo y fenilacetato de metilo. Los valores de actividad se dan por nmol de éster hidrolizado ($\text{IU} \cdot 10^{-3}$) por minuto y mg de enzima.

IU/mg _{TLL} · 10 ⁻³	D,L-mandelato de metilo			Fenilacetato de metilo			Hexanoato de etilo		
pH	5	7	8.5	5	7	8.5	5	7	8.5
TLL-MCI	10	16	17.5	0.03	0.06	0.03	125	25	20
TLL-Octyl	4.8	6	3.1	0.12	0.21	0.09	480	165	17
RML-MCI	15	105	142	0.07	2.1	2.24	333	13	0.2
RML-Octyl	4.5	6.2	4.5	0.02	0.03	<10 ⁻³	671	435	0.13
Le-MCI	5.8	55	47	4.41	4.5	10	32	30	29
Le-Octyl	0.55	1.35	11	<0.01	<0.01	<0.01	0.04	0.66	0.1

En la siguiente tabla (Tabla 8) se muestran los datos de actividad de los biocatalizadores inmovilizados en MCI y los biocatalizadores comerciales de TLL y RML.

Tabla 8. Actividad por g de biocatalizador del biocatalizador TLL-MCI, y RML-MCI y los biocatalizadores comerciales TL-IM, y RM-IM, en las reacciones de hidrólisis estudiadas a diferentes valores de pH. Se utilizaron biocatalizador de TLL-MCI y RML-IM preparados con una carga enzimática de 50mg/g.

IU/g _{biocatalizador} · 10 ⁻³	D,L-mandelato de metilo			Fenilacetato de metilo			Hexanoato de etilo		
pH	5	7	8.5	5	7	8.5	5	7	8.5
TLL-MCI	510	800	870	14	31.5	13.5	6325	1249	1010
TL-IM	6.25	8.5	3.2	15	29	9	1133	186	150
RML-MCI	712	5250	7100	3.7	105	112	16650	642	10.2
RML-IM	75	490	590	7820	2310	7900	985	78	17

6.2 Bioprocesos.

6.2.1 Transesterificación.

6.2.1.1 Producción de ésteres metílicos de ácidos grasos catalizada por CalB.

Se estudió la reacción de transesterificación para producción de biodiesel utilizando dos biocatalizadores de CalB, el biocatalizador comercial, Novo435, y el biocatalizador preparado al inmovilizar CalB en el soporte de poli-estireno-divinilbenceno, CalB-MCI. Mediante el diseño de experimentos, se establecieron las condiciones óptimas para obtener un valor máximo de la velocidad inicial de la transesterificación. Una vez conocidas estas condiciones, se compararon los dos biocatalizadores en términos de conversión y reutilización del biocatalizador en varios ciclos de uso.

Para la reacción de transesterificación se utilizaron como sustratos, aceite de soja refinado y metanol. La reacción se llevó a cabo a 30°C.

6.2.1.2 Diseño experimental.

La planificación de los experimentos de transesterificación se organizó atendiendo a los procedimientos del diseño experimental utilizando los métodos de superficie de respuesta (MSR) y los diseños compuestos centrales (DCC). Se establecieron tres variables dependientes para la optimización de la velocidad inicial de la transesterificación; las variables estudiadas fueron, la

razón molar entre los substratos (metanol: aceite de soja), X_1 ; el contenido de enzima, X_2 , y la cantidad de agua añadida inicialmente, X_3 ; estas dos últimas variables están referidas al porcentaje de fracción molar de aceite.

Los valores que tomaron las variables en la secuencia de experimentos se muestran en la Tabla 9. La velocidad de reacción se calculó a partir del procedimiento explicado en la sección 5.2.1 basado en el análisis por cromatografía de gases.

Tabla 9. Variables del diseño experimental y sus valores reales a cada nivel de codificación. Siendo x_1 , la razón molar de sustrato (metanol: aceite), x_2 , la cantidad de enzima (% de la fracción másica de aceite), y x_3 , la cantidad de agua añadida inicialmente (% fracción másica de aceite).

Variable/valores codificados	-1.68	-1	0	1	1.68
x_1	3	4.21	6	7.78	9
x_2	5	9.04	15	20.95	25
x_3	0	2.02	5	7.97	10

La matriz correspondiente al diseño experimental (DCC), para tres variables, consta de, 17 experimentos (8 centrales, 6 en los ejes o axiales, y tres experimentos que corresponden a las repeticiones en el punto central). En la Tabla 10, se recoge la matriz del diseño, con los valores codificados de las variables en cada análisis, junto con los resultados obtenidos de la experimentación, expresados como velocidad inicial de la esterificación.

Tabla 10. Matriz del diseño compuesto central con los valores codificados de las variables, X_1 , X_2 , X_3 . Experimentos propuestos a partir del diseño experimental y resultados de la experimentación expresados en velocidad inicial de la transesterificación ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), para el biocatalizador CalB-MCI, y Novo435.

Experimento	X_1	X_2	X_3	$v_{\text{inicial}}(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	
				Novo435	CalB-MCI
1	-1	-1	-1	3.46	15.24
2	-1	-1	1	5.8	6.82
3	-1	1	-1	14.86	29.07
4	-1	1	1	22.78	24.38
5	1	-1	-1	1.95	7.98
6	1	-1	1	3.35	2.6
7	1	1	-1	11.95	25.26
8	1	1	1	12.49	14.2
9	-1.68	0	0	20.08	31.98
10	1.68	0	0	10.63	18.73

11	0	-1.68	0	6.77	4.92
12	0	1.68	0	50.07	47.68
13	0	0	-1.68	15.31	41.56
14	0	0	1.68	21.64	8.93
15	0	0	0	18.81	23.51
16	0	0	0	22.18	24.11
17	0	0	0	24.22	20.9

A partir del ajuste de los datos experimentales a una ecuación polinomial de segundo orden (ecuación [3]) se obtuvieron los siguientes modelos para predecir el comportamiento de la transesterificación; la ecuación [4], corresponde al ajuste del biocatalizador Novo435, y la ecuación [5] a CalB-MCI.

$$Y = 22.52 + 9.30X_2 - 4.89X_1^2 - 3.79X_3^2 [4]$$

$$Y = 23.51 - 3.49X_1 - 9.68X_2 - 6.18X_3 [5]$$

Del test de Fisher para el análisis de varianza se obtuvieron los valores de F y la probabilidad asociada, p; para CalB-MCI, los valores fueron F de 4.40, y p=0.0317; para Novo435, F de 6.50 y p=0.0109.

Para la ecuación [4], asociada a Novo435, el coeficiente de determinación, fue $R^2 = 0.71$, y el coeficiente de correlación $R = 0.84$. Los parámetros de regresión para CalB-MCI fueron $R^2 = 0.78$, y $R = 0.88$.

En la Tabla 11 se muestran los efectos de las variables en la respuesta, obtenidos a partir del análisis estadístico del modelo de diseño experimental central compuesto (DCC). Aparecen los efectos lineales, cuadráticos y las interacciones entre los efectos cruzados de dos variables.

Tabla 11. Resultados del análisis estadístico del modelo polinómico de segundo orden donde se indican los efectos lineal, cuadráticos y las interacciones de las variables para los biocatalizadores CalB-MCI, y Novo435.

		Novo435			CalB-MCI		
Variable		Efecto de las variables	Error estándar	p-valor	Efecto de las variables	Error estándar	p-valor
Media		22.525	1.574	0.005	23.514	0.985	0.002
lineal	X_1	-4.845	1.479	0.082	-6.995	0.925	0.017
	X_2	18.612	1.479	0.006	19.364	0.925	0.002
	X_3	3.350	1.479	0.152	-12.367	0.925	0.006

cuadrático	X_1X_1	-9.795	1.630	0.0027	-2.729	1.020	0.116
	X_2X_2	0.879	1.630	0.644	-2.062	1.020	0.181
	X_3X_3	-7.584	1.630	0.043	-2.812	1.020	0.110
interacciones	X_1X_2	-2.312	1.932	0.354	-0.630	1.209	0.654
	X_2X_3	-2.080	1.932	0.394	-0.830	1.209	0.563
	X_3X_1	1.179	1.932	0.604	-0.489	1.209	0.725

Los efectos indican la influencia de la variable dependiente en la respuesta (Y); cuando los valores son positivos, el aumento del valor de la variable, supone una mejora de la respuesta (y a la inversa para los valores negativos).

6.2.1.3 Comparación del curso de la transesterificación bajo condiciones óptimas.

A partir del análisis estadístico del modelo usando el programa Statistica 7.0, se obtuvieron los valores óptimos de las variables que predecían un máximo valor de la respuesta, es decir, el máximo de la velocidad inicial de la reacción. En la Tabla 12 se indican los valores óptimos que se aplicaron para la experimentación y obtención del curso de la transesterificación mostrado en la Figura 8.

Tabla 12. Valores experimentales de las variables que maximizan la velocidad inicial en la transesterificación de aceite de soja utilizando los biocatalizadores CalB-MCI, y Novo435. Valores obtenidos del análisis estadístico del modelo de diseño experimental.

Valor óptimo/ biocatalizador		Novo435	CalB-MCI
x_1	Razón molar (metanol:aceite)	5.6:1	3:1
x_2	Cantidad de biocatalizador	25	25
x_3	Cantidad de agua añadida	5.44	1.18

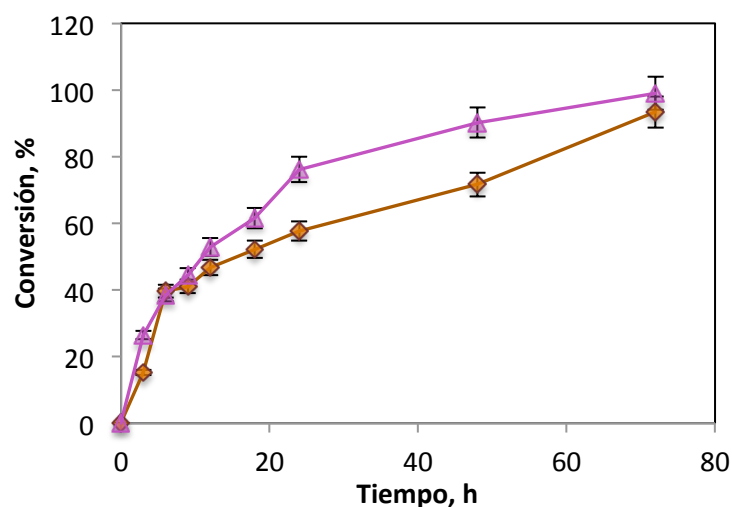


Figura 8. Curso de la reacción de transesterificación de los biocatalizadores estudiados bajo condiciones óptimas, Novo435 (rombos), CalB-MCI (triángulos).

6.2.1.4 Reutilización de los biocatalizadores.

Gracias a la fácil recuperación de los biocatalizadores inmovilizados, después de su uso, estos fueron reutilizados para observar su actividad en varios ciclos de reacción. A su vez, se probaron dos tipos de tratamientos para recuperar el biocatalizador antes de su reutilización; los biocatalizadores fueron recuperados y sometidos a filtración simple o a un lavado con hexano. Los resultados de estas experiencias se recogen en la Figura 9.

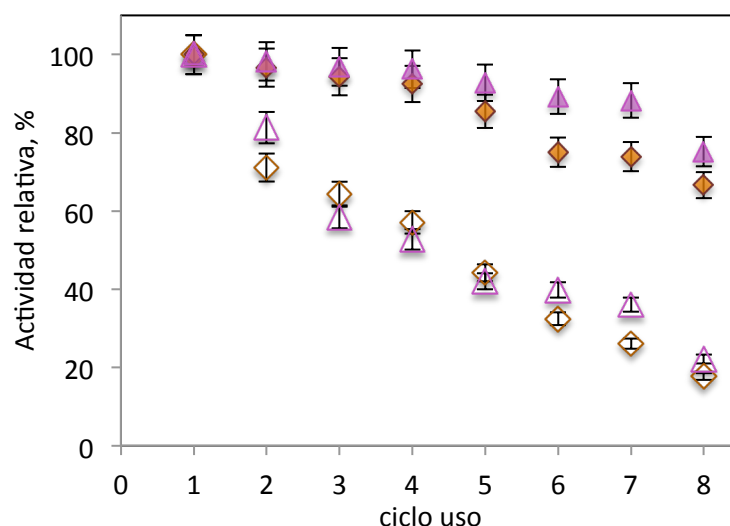


Figura 9. Efecto de la reutilización en la actividad de los biocatalizadores. Se representa la actividad relativa en cada ciclo respecto a la actividad inicial (100%). Los símbolos con fondo representan aquellas reacciones en las que se aplicó el lavado con hexano entre ciclos. Los símbolos que representan a los biocatalizadores son, triángulos, para CalB-MCI, y rombos, Novo435.

6.2.2 Síntesis de ésteres aromáticos.

Junto con la transesterificación, se valoró la utilización de los biocatalizadores disponibles en reacciones de esterificación para producir aromas y sabores de fruta.

Como sustrato se utilizaron ácidos carboxílicos y alcoholes de cadena corta.

Los resultados se han organizado, primero, presentado la evaluación de los biocatalizadores comerciales (Novo435, TL-IM, y RM-IM), y la comparación entre ellos. Para posteriormente aplicar en reacciones de esterificación, los biocatalizadores preparados a partir de algunas de las enzimas inmovilizadas en el soporte de poli-estireno-divinilbenceno (MCI).

6.2.2.1 Comparación de los biocatalizadores comerciales en reacciones de esterificación.

Los biocatalizadores comerciales disponibles, Novo435, TL-IM, y RM-IM, se evaluaron en reacciones de esterificación de diferentes ácidos de cadena corta y diferentes alcoholes. Una vez elegido el sustrato (ácido y alcohol) para cada biocatalizador, se realizó un diseño experimental compuesto central con cuatro variables para cada biocatalizador, y de ahí se obtuvieron las condiciones óptimas de reacción. Bajo las condiciones óptimas se compararon los cursos de esterificación y se evaluó la capacidad de cada biocatalizador para retener la actividad de esterificación en sucesivas etapas de reacción.

6.2.2.1.1 Elección del sustrato.

En estos ensayos se utilizaron tres ácidos (ácido acético, propiónico, y butírico), y cuatro alcoholes (etanol, 2-propanol, 1-butanol, y 1-pentanol). Las condiciones experimentales para la temperatura, la cantidad de biocatalizador, y la razón molar, se establecieron inicialmente, de acuerdo con ensayos previos (Martins A.B. y col. 2011, Lorenzoni A.S.G. y col. 2012, Friedrich J.L.R. 2013).

En la Figura 10 se han representado el rendimiento de la esterificación de cada biocatalizador para cada combinación de sustrato, ácido y alcohol.

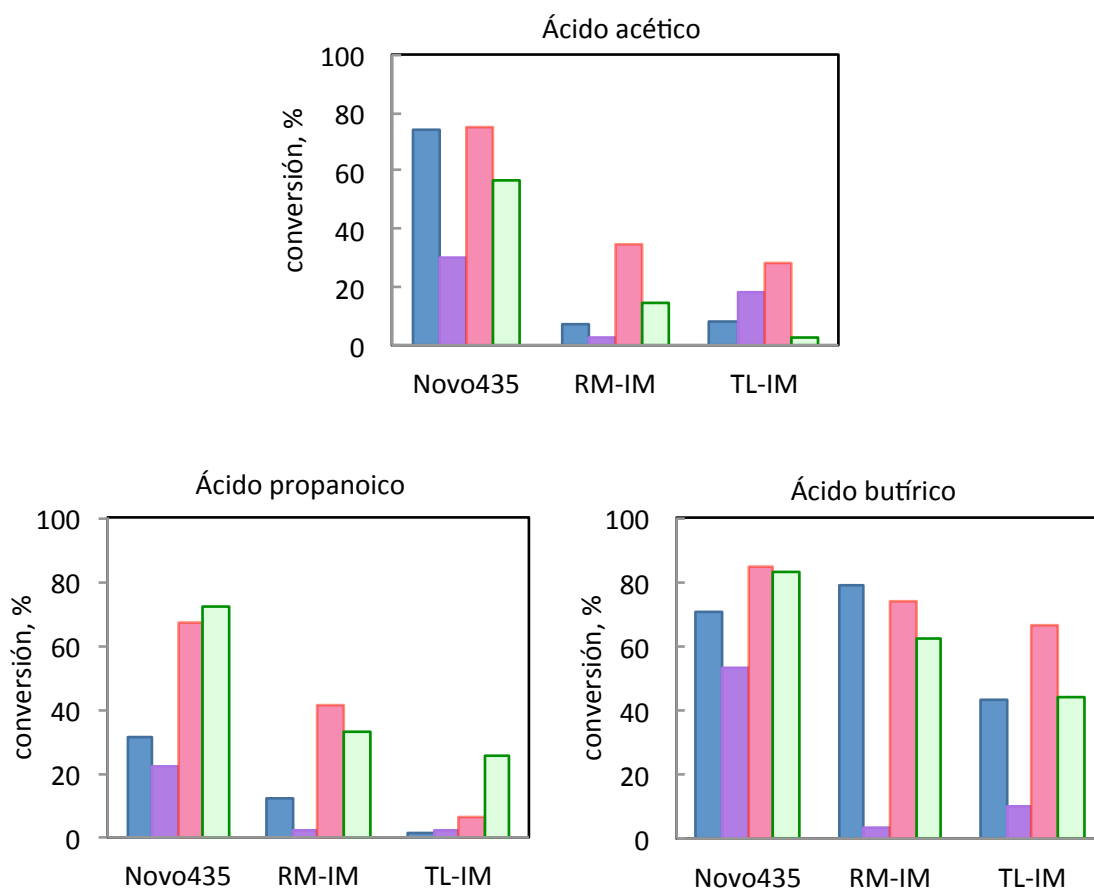


Figura 10. Esterificación catalizada por los biocatalizadores comerciales, Novo435, TL-IM, y RM-IM. Las condiciones de reacción fueron, 0.1M de ácido y alcohol (razón molar 1:1), una concentración de biocatalizador del 10%(respecto a la fracción másica de sustrato) y una temperatura de 40°C, para Novo435, y RM-IM, y para TL-IM, 30% y 50°C. En el diagrama de barras se representan por colores, los alcoholes: el azul representa el etanol; el morado, el 2-propanol; el rosa, el 1-butanol, y el verde, el 1-pentanol.

Para Novo435 se eligió como sustratos el ácido acético y 1-pentanol; para RM-IM, ácido butírico y 1-pentanol; y para TL-IM, ácido butírico y etanol. Los ésteres que se generan en estas reacciones son agentes saborizantes de fruta; manzana y plátano para Novo435, albaricoque y pera para RM-IM y para TL-IM, se consiguen sabores a piña y mango.

6.2.2.1.2 Diseño experimental.

Con los substratos elegidos en el análisis anterior, se desarrolló un diseño experimental central compuesto para optimizar la conversión de la reacción de esterificación de cada uno de los biocatalizadores. Se construyó la matriz del diseño mostrada en la Tabla 13, donde se tienen cuatro variables dependientes, la temperatura, X_1 , la razón molar de substrato (alcohol: ácido), X_2 , el contenido de biocatalizador, X_3 , y la cantidad de agua inicial añadida, X_4 (estas dos últimas, X_3 y X_4 expresadas como porcentaje de la suma de la masa de ambos substratos en cantidades estequiométricas). En la Tabla 13 se muestran los resultados de la esterificación para cada biocatalizador en cada experimento del diseño. El rendimiento de la esterificación fue medido mediante el análisis del ácido residual en el volumen de reacción de acuerdo con lo mencionado en la sección 5.2.2.1.

Los rangos de estudio de las variables fueron: para la temperatura, se realizaron experimentos en rango de entre [30-60]°C, la razón molar, entre [1:1-5:1], la cantidad de agua añadida [0-1]%. Para la cantidad de biocatalizador, se trabajó en un intervalo de entre 1-10% para Novo435 y RM-TL, y, dado que TL-IM se mostró menos activo, se utilizó un rango de mayor amplitud para este biocatalizador, entre [5-45] %.

Para cada biocatalizador, de las ecuaciones de ajuste del modelo, se llevó a cabo el análisis de varianza, donde resultaron valores del test de Fisher de 13.06 para Novo435, 2.63 para RM-IM, y 6.77 para TL-IM, todos estadísticamente significativos, dados los valores de p, de <0.0001, para Novo435, 0.045, para RM-IM, y 0.0007 para TL-IM. Los coeficientes de determinación (R^2) y correlación (R) fueron, para todos los modelos, superiores a 0.8. Las expresiones de ajuste según el modelo polinomial de segundo orden se muestran a continuación, en las ecuaciones [6], [7], y [8]:

$$Y_1 = 44.27 + 10.57X_1 - 1.30X_1^2 - 1.16X_2 + 1.62X_2^2 + 14.54X_3 + 1.69X_3^2 - 0.03X_4 + 0.32X_4^2 + 1.41X_1X_2 - 0.81X_1X_3 - 0.98X_1X_4 + 0.50X_2X_3 - 1.12X_2X_4 - 2.06X_3X_4 \text{ [6]}$$

$$Y_2 = 48.60 + 2.53X_1 - 6.28X_1^2 - 1.97X_2 - 0.27X_2^2 + 14.61X_3 + 1.33X_3^2 - 0.88X_4 - 3.75X_4^2 - 0.03X_1X_2 + 1.40X_1X_3 + 0.52X_1X_4 + 0.92X_2X_3 + 0.350X_2X_4 - 1.76X_3X_4 \text{ [7]}$$

$$Y_2 = 55.55 - 9.01X_1 - 7.555X_1^2 - 9.86X_2 - 6.37X_2^2 + 14.71X_3 - 3.62X_3^2 - 1.05X_4 - 2.28X_4^2 + 12.55X_1X_2 - 3.13X_1X_3 + 0.94X_1X_4 + 0.27X_2X_3 - 5.51X_2X_4 - 0.86X_3X_4 \text{ [8]}$$

La ecuación [6] corresponde al rendimiento de la reacción de producción de acetato de pentilo catalizada por Novo435; la ecuación [7] al rendimiento de acetato de pentilo, catalizado por RM-TL, y la ecuación [8] predice el rendimiento de butirato de etilo catalizado por TL-IM.

Tabla 13. Matriz del diseño experimental con cuatro variables, X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 . Conjunto de experimentos donde se indican los niveles codificados de las variables y resultado de la experimentación para cada biocatalizador, expresado en porcentaje de la conversión de esterificación. La esterificación se midió a las 2h para Novo435 y RM-IM, y a las 5h para TL-IM.

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	Rendimiento de esterificación, %		
					Novo435	RM-IM	TL-IM
1	-1	-1	-1	-1	25.67	30.17	43.24
2	-1	-1	-1	1	25.19	23.48	48.38
3	-1	-1	1	-1	54.43	60.00	77.62
4	-1	-1	1	1	59.71	62.18	81.71
5	-1	1	-1	-1	11.51	29.17	13.14
6	-1	1	-1	1	19.94	33.87	12.10
7	-1	1	1	-1	53.81	51.45	44.67
8	-1	1	1	1	47.58	42.06	30.29
9	1	-1	-1	-1	32.09	48.75	0.48
10	1	-1	-1	1	50.17	53.49	24.06
11	1	-1	1	-1	78.17	72.29	17.14
12	1	-1	1	1	75.37	67.47	24.48
13	1	1	-1	-1	43.58	29.76	28.86
14	1	1	-1	1	45.13	39.32	4.19
15	1	1	1	-1	69.64	78.47	45.62
16	1	1	1	1	67.94	74.62	37.62
17	-2	0	0	0	14.92	35.92	42.52
18	2	0	0	0	59.68	1.25	18.19
19	0	-2	0	0	45.57	44.35	68.86
20	0	2	0	0	52.47	40.17	0.76
21	0	0	-2	0	25.32	16.13	3.71
22	0	0	2	0	73.23	81.25	87.90
23	0	0	0	-2	49.57	62.77	55.52
24	0	0	0	2	38.09	53.97	46.86
25	0	0	0	0	48.60	43.86	60.10
26	0	0	0	0	36.44	46.67	55.00
27	0	0	0	0	47.94	55.29	58.76
28	0	0	0	0	44.13	48.62	48.38

Los efectos lineales de las variables en el modelo se han agrupado, para cada biocatalizador, en la Tabla 14.

Tabla 14. Efectos lineales del modelo de regresión del diseño compuesto central, para las reacciones catalizadas por los tres biocatalizadores comerciales.

	Variable/Efecto lineal	Novo435	RM-IM	TL-IM
x_1	Temperatura	21.14	5.07	-18.03
x_2	Razón molar (alcohol:ácido)	-2.32	-3.95	-19.73
x_3	Cantidad de biocatalizador	29.09	29.23	29.42
x_4	Cantidad de agua añadida	-0.06	-1.76	-2.11

A partir del análisis estadístico usando la herramienta Statistica 7.0, se hallaron las condiciones óptimas para las reacciones de esterificación de los tres biocatalizadores. Estas condiciones, mostradas en la Tabla 15, fueron las utilizadas para validar experimentalmente el modelo propuesto en el diseño experimental.

Tabla 15. Condiciones óptimas de las variables para obtener el máximo de respuesta según la predicción del diseño experimental.

	Variable/valor óptimo	Novo435	RM-IM	TL-IM
x_1	Temperatura (°C)	50	47.5	32.5
x_2	Razón molar (alcohol:ácido)	3:1	2.4:1	1.7:1
x_3	Cantidad de biocatalizador (%)	7.75	10	40
x_4	Cantidad de agua añadida (%)	0.25	0.12	0.38

6.2.2.1.3 Comparación de los cursos de esterificación bajo condiciones óptimas.

Dadas las condiciones óptimas de esterificación en la Tabla 15, se llevaron a cabo las reacciones de esterificación para cada biocatalizador. En la Figura 11 se muestran los cursos de reacción.

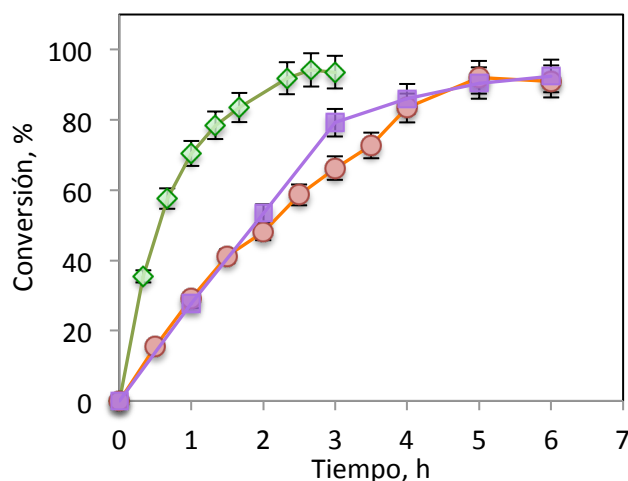


Figura 11. Curso de las reacciones de esterificación para los tres biocatalizadores comerciales en las condiciones óptimas. Producción de acetato de pentilo catalizada por Novo435 (rombos), 50°C, razón molar 3:1, 7.75% biocatalizador, 0.25% agua. Butirato de pentilo, catalizado por RM-IM (círculos), 47.5°C, razón molar 2.4:1, 10% biocatalizador, 0.12% agua; y, butirato de etilo, catalizado por TL-IM (cuadrados), 32.5°C, razón molar 1.7:1, 40% biocatalizador, 0.38% agua.

6.2.2.1.4 Reutilización de los biocatalizadores.

La fácil recuperación y la reutilización de los biocatalizadores inmovilizados, es un factor a tener en cuenta para su aplicación industrial. Los biocatalizadores comerciales se sometieron a varias etapas de reacción y se evaluó su actividad en los sucesivos ciclos de esterificación. Después de cada etapa de reacción los biocatalizadores se lavaron con n-hexano. En la Figura 12 se ha representado el valor de la actividad en cada ciclo, respecto al valor inicial del rendimiento en las reacciones de esterificación.

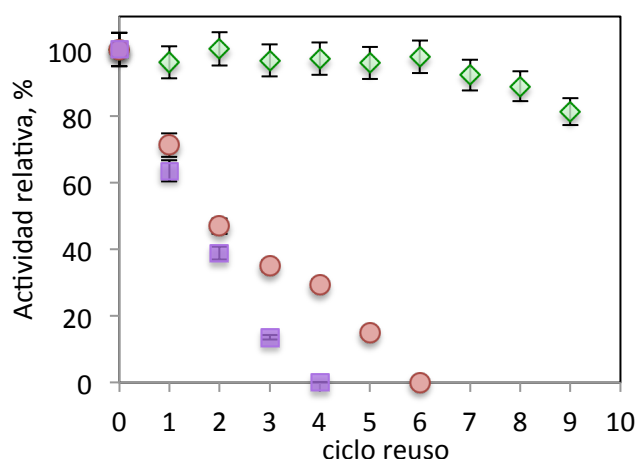


Figura 12. Estabilidad de los biocatalizadores comerciales ante varios ciclos de reacción estudiada bajo las condiciones óptimas de operación: Novo435 (rombos), 50°C, razón molar 3:1, 7.75% biocatalizador, 0.25% agua. RM-IM (círculos), 47.5°C, razón molar 2.4:1, 10% biocatalizador, 0.12% agua; y TL-IM (cuadrados), 32.5°C, razón molar 1.7:1, 40% biocatalizador, 0.38% agua.

6.2.2.2 Comparación del nuevo biocatalizador CalB-MCI y el comercial, Novozym 435 en reacciones de esterificación.

El nuevo biocatalizador preparado en el laboratorio ,CalB-MCI, se comparó con el derivado comercial Novo435 en reacciones de esterificación para la síntesis acetato de butilo, y butirato de etilo, productos utilizados en la obtención de esencias de fruta y perfumes.

Los resultados obtenidos en el estudio comparativo se han organizado por éster, primero la síntesis del acetato de butilo, y luego la síntesis del butirato de etilo. Se estudió inicialmente el efecto de la presencia de concentraciones crecientes de ácido en la actividad de los biocatalizadores. Este estudio previo permite establecer un valor de la concentración de ácido para trabajar posteriormente en el análisis de los efectos de las variables consideradas sobre la reacción; la variables estudiadas fueron, la razón molar de sustratos (alcohol:ácido), la cantidad de biocatalizador, la cantidad de agua inicial añadida, y la temperatura. El análisis de las variables se realizó de dos maneras diferentes; para el acetato de butilo, se propuso un análisis independiente y sucesivo de las variables, utilizando el valor óptimo de la variable anterior para estudiar la siguiente. Y para el butirato de etilo se aplicaron herramientas estadísticas del diseño experimental, evaluando las variables de manera conjunta y permitiendo evaluar las interacciones entre éstas.

Para que la comparación sea más precisa, se realizó una electroforesis (SDS-PAGE) de los dos biocatalizadores, cuya preparación fue descrita en la sección 5.1.2. Es posible hacer una comparación semicuatitativa de la masa de enzima presente en cada biocatalizador aprovechando el carácter reversible de la inmovilización, descrito mediante adsorción hidrofóbica para ambos materiales. Al hervir las muestras en SDS es posible desorber la enzima del soporte y analizar la enzima libre, por electroforesis SDS-PAGE del sobrenadante.

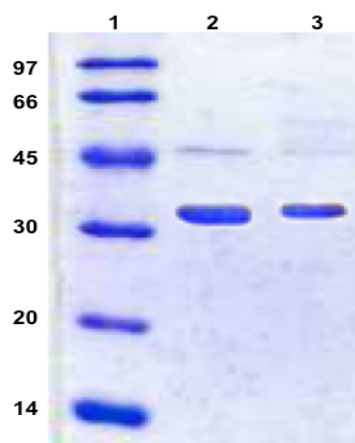


Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de los biocatalizadores de CalB. Canal 1, marcado de peso molecular (kDa), canal 2: CalB-MCI, canal 3: Novo435.

6.2.2.2.1 Síntesis del acetato de butilo.

Antes de comenzar la optimización de las variables de la esterificación se llevó a cabo una serie de experimentos donde se evaluó el efecto del ácido sobre la actividad de la esterificación. Los resultados se representaron en una gráfica (Figura 14). Se decidió utilizar una concentración de ácido de 0.3M, para que así la estabilidad de ambos biocatalizadores no dependiera del ácido y ambos biocatalizadores pudieran ser comparados.

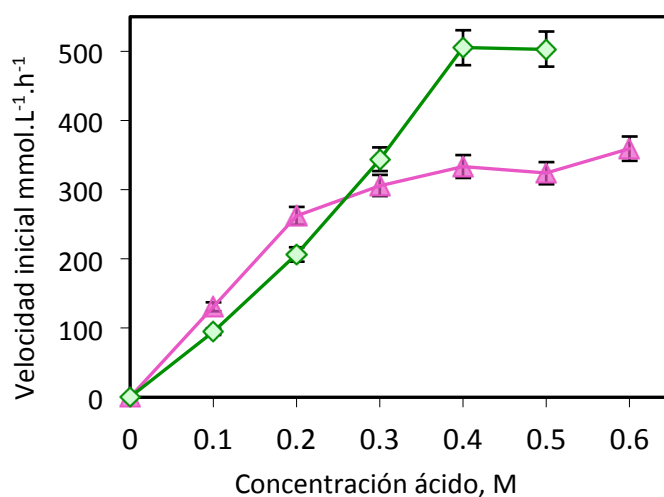


Figura 14. Efecto de la concentración de ácido acético en la velocidad de inicial de reacción de los biocatalizadores de CalB, Novo435 (rombos), CalB-MCI (triángulos). Las condiciones de reacción fueron: 10% de biocatalizador (referido a la suma de las masas de sustrato), 30°C, y razón molar 1:1 (n-butanol: acético)

6.2.2.2.1.1 Efecto de la razón molar de sustrato en la actividad de esterificación.

La razón molar de sustrato se refiere al exceso de alcohol sobre el valor estequiométrico (0.3M), lo que afecta al equilibrio de la reacción.

En estos ensayos se estudiaron valores de la razón molar de sustrato (n-butanol: ácido acético) de entre 1:1 a 7:1. Las demás variables se fijaron en, un contenido del 10% de biocatalizador, 0% de agua inicial (referidas estas dos variables a la fracción másica de la suma de los sustratos), y una temperatura de 30°C.. En la Figura 15 se muestran las tendencias de las velocidades iniciales frente a la variable estudiada. Se escogieron los valores óptimos que producían la máxima velocidad inicial para cada biocatalizador, la razón 3:1 para Novo435, y 5:1 para CalB-MCI.

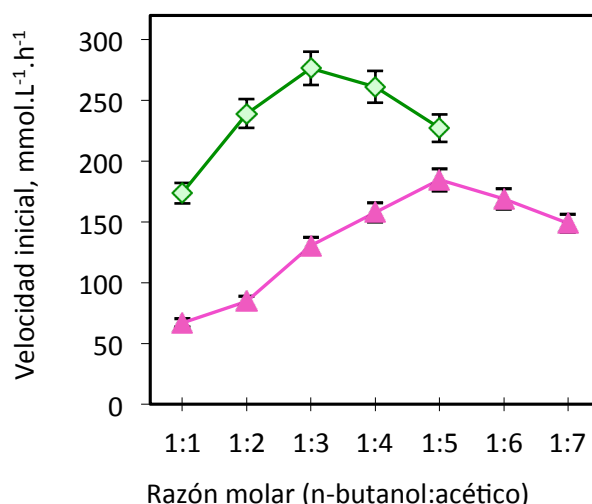


Figura 15. Efecto de la razón molar en la velocidad inicial de esterificación catalizada por los biocatalizadores de CalB, Novo435 (rombos), y CalB-MCI (triángulos). Las condiciones de reacción fueron: 0.3M, concentración de ácido, 10% de biocatalizador (referido a la suma de las masas de sustrato), y 30°C.

En esta comparación se escogieron las razones molares con las que se obtuvieron mayores valores de la velocidad inicial, 3:1 para Novo435, y 5:1, para CalB-MCI.

6.2.2.2.1.2 Efecto de la cantidad de biocatalizador en la velocidad inicial de reacción.

Para una concentración de sustrato de 0.3M y 30°C y los valores optimizados en el punto anterior para la razón molar (3:1, para Novo435, y 5:1, para CalB-MCI) se estudió el efecto del aumento de la cantidad de biocatalizador en la velocidad inicial de la reacción de esterificación. Los valores que tomó la variable estudiada variaron entre 1 y 20% referido a la suma de las masas de los sustratos, ácido acético y n-butanol. En la Figura 16 se muestran los resultados de la

experimentación. El valor considerado como óptimo para el estudio de la siguiente variable fue el 10% de biocatalizador.

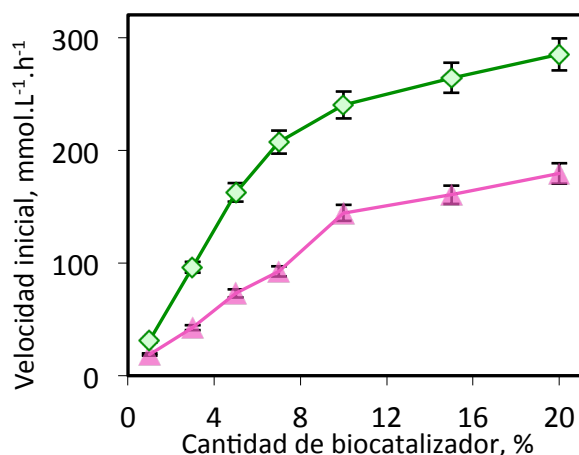


Figura 16. Evaluación del efecto de la cantidad de biocatalizador usado en la velocidad inicial del biocatalizador. La cantidad de biocatalizador se refiere al porcentaje de la suma de las masas de sustrato. Se utilizó una concentración de 0.3M de sustrato y 30°C. Novo435 (rombos), razón molar, alcohol:ácido, 3:1, CalB-MCI (triángulos), razón molar 5:1.

6.2.2.2.1.3 Efecto de la cantidad de agua añadida en la actividad de esterificación.

Para realizar eficientemente sus funciones catalíticas, las enzimas precisan tener un grado de hidratación. Los experimentos de esterificación se llevaron a cabo en medio orgánico, anhidro, por lo que se evaluó añadir agua en el medio de reacción, para promover una buena actuación de la enzima .

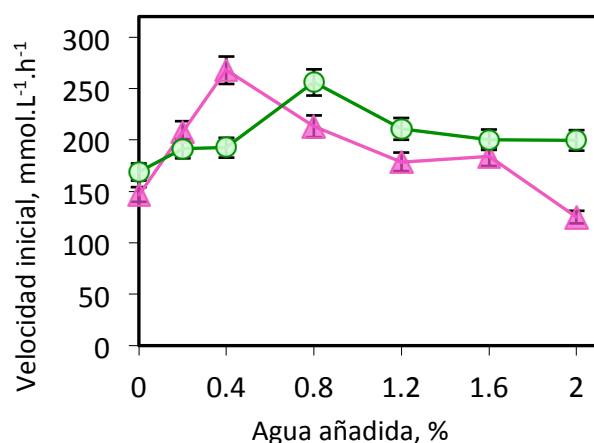


Figura 17. Efecto de la cantidad de agua añadida en la velocidad inicial de esterificación. Se utilizó una concentración de sustrato de 0.3M, y 30°C una razón molar para Novo435 de 3:1, y de 5:1 para CalB-MCI, y un 10% de biocatalizador para ambos. La cantidad de agua añadida y biocatalizador se refiere al porcentaje de la suma de las masas de sustrato. Novo435(rombos), CalB-MCI (triángulos).

En la Figura 17 se muestran los resultados experimentales del estudio de la influencia del contenido de agua para los dos biocatalizadores. Los valores máximos de la velocidad inicial se

consiguen en los dos biocatalizadores para cantidades de agua añadida de 0.8% para Novo435, y 0.4% para CalB-MCI.

6.2.2.2.1.4 Efecto de la temperatura en la actividad de esterificación.

Se estudió el comportamiento de los biocatalizadores en la esterificación para condiciones de temperatura que variaron entre 25 y 50°C. En la Figura 18 se observa el efecto de la temperatura bajo las condiciones óptimas de las variables hasta ahora estudiadas. En la tendencia de la velocidad inicial se observan los máximos de 35°C para Novo435, 40°C y de , para CalB-MCI.

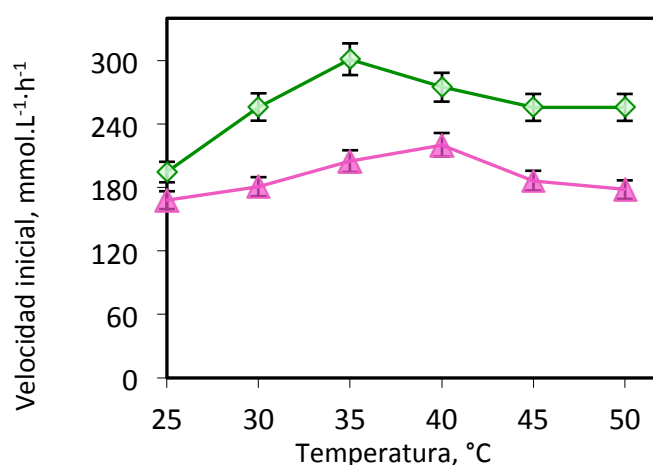


Figura 18.Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de formación del acetato de butilo bajo las condiciones óptimas de las variables estudiadas. Novo435 (rombos), concentración de ácido acético 0.3M, razón molar 3:1, 10% biocatalizador, 0.8% de agua inicial. CalB-MCI (triángulos), concentración de ácido acético 0.3M, razón molar 5:1, 10% biocatalizador, 0.4% de agua inicial.

6.2.2.2.1.5 Esterificación en condiciones óptimas.

Utilizando los valores óptimos de las variables anteriormente estudiadas se llevaron a cabo los experimentos de esterificación con los biocatalizadores de la enzima CalB; se hizo un seguimiento del curso de la reacción tomando muestras periódicamente y calculando la cantidad de éster hasta las 2h de reacción (según lo explicado en la sección 5.2.2.1). Los resultados fueron recogidos en la Figura 19 donde se representa la conversión de la esterificación frente al tiempo.

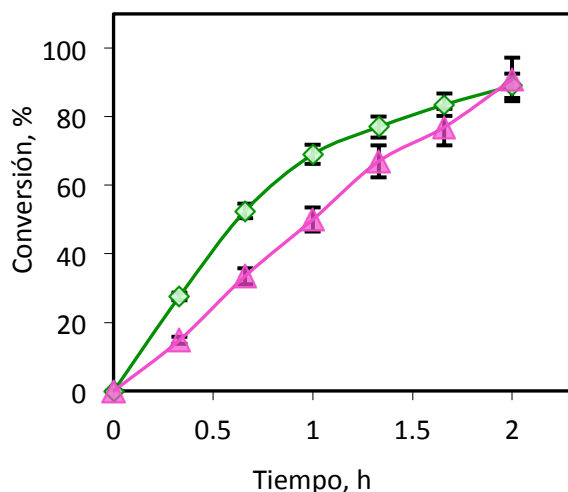


Figura 19. Curso de la esterificación bajo las condiciones óptimas establecidas para cada biocatalizador. La concentración de los sustratos fue de 0.3M y un 10% de biocatalizador respecto a la masa de sustrato para ambos biocatalizadores. Novo435 (rombos) 3:1 alcohol:ácido, 0.8% cantidad de agua (respecto a la masa de sustrato), y 35°C. CalB-MCI (triángulos), 5:1 alcohol:ácido, 0.4% de agua, y 40°C.

6.2.2.2.1.6 Reutilización de los biocatalizadores.

Para evaluar la capacidad de reutilización de los biocatalizadores se llevaron a cabo sucesivas etapas de esterificación. Entre dos ciclos de reacción, los biocatalizadores se filtraron y dejaron secar hasta el día siguiente. En la Figura 20 se representaron los resultados de la experimentación.

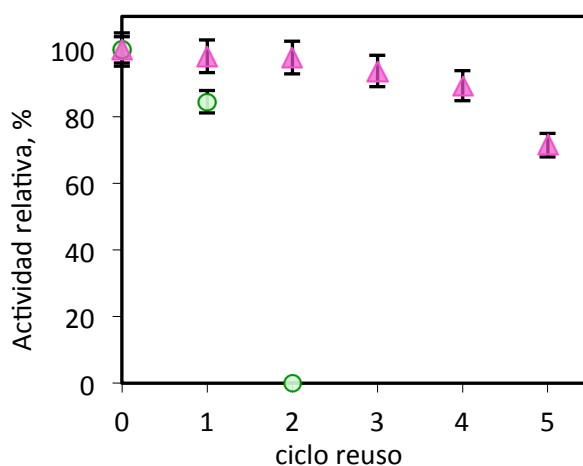


Figura 20 Estabilidad de los biocatalizadores Novo435 (rombos), y CalB-MCI (triángulos) en sucesivas etapas de esterificación. Ambos biocatalizadores operaron bajo condiciones óptimas. Novo435, 3:1 alcohol:ácido, 0.8% cantidad de agua (respecto a la masa de sustrato), y 35°C; CalB-MCI (triángulos), 5:1 alcohol:ácido, 0.4% de agua, y 40°C.

6.2.2.2.2 Síntesis del butirato de etilo.

El estudio del efecto de la concentración de ácido es importante para determinar la máxima concentración de ácido que permite a la enzima mostrar su actividad óptima, ya que, en principio, a mayor cantidad de ácido, mayor cantidad de éster sintetizado.

Se prepararon experimentos en los que se utilizaron concentraciones de ácido butírico desde 0.1 a 1M, y se calculó la velocidad de esterificación en función de la concentración de ácido. Los resultados se muestran en la Figura 21.

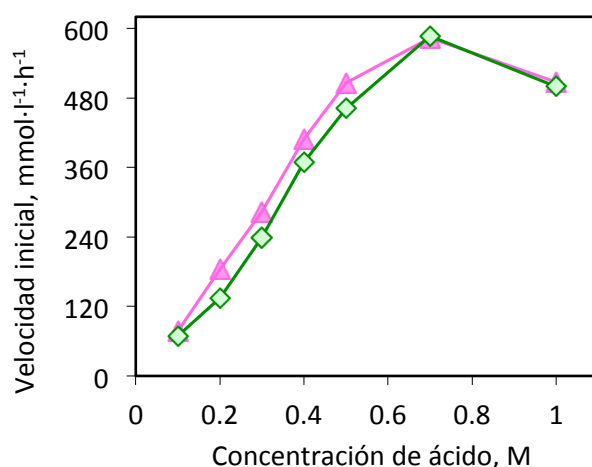


Figura 21. Efecto de la concentración de ácido butírico sobre la velocidad inicial de esterificación. Novo435 (rombos), CalB-MCI (triángulos). Condiciones de reacción: contenido de biocatalizador 5%, razón molar 1:1 etanol: ácido butírico, y temperatura 37°C.

El valor que se utilizó para los siguientes experimentos fue 0.7M para ambos biocatalizadores.

6.2.2.2.2.1 Diseño experimental.

La optimización de la conversión de la esterificación se estudió para cuatro variables independientes en un diseño compuesto central con 28 experimentos (16 puntos factoriales, 8 axiales, y 4 replicas del punto central). Las variables, y los valores de cada uno de sus niveles están agrupados en la Tabla 16. Este diseño fue aplicado a los dos biocatalizadores de CalB, en cada caso se obtuvo la ecuación polinomial de segundo orden del modelo (ecuaciones [9] y [10])

Tabla 16. Variables del diseño experimental compuesto central propuesto para la optimización de la conversión de síntesis del butirato de etilo para los biocatalizadores de CalB. Valores de las variables para cada nivel. El porcentaje de biocatalizador y cantidad de agua se refieren a la suma de las masas de los sustratos en relación estequiométrica.

Variable/valores codificados	-2	-1	0	1	2
------------------------------	----	----	---	---	---

x_1 (temperatura, °C)	25	31	37.5	44	50
x_2 (razón molar, etanol:butírico)	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1
x_3 (biocatalizador, %)	1	2.5	0.5	7.5	10
x_4 (agua, %)	0	0.25	0.5	0.75	1

En la

Tabla 17 se muestran los resultados de los análisis según los experimentos organizados en el diseño; la variable respuesta fue la conversión a butirato de etilo medida después de 1h de reacción.

Las ecuaciones del modelo para ambos biocatalizadores se muestran a continuación, siendo Y_1 , la ecuación que ajusta el comportamiento de Novo435, y Y_2 , la ecuación para CalB-MCI:

$$Y_1 = 61.80 + 6.19X_2 + 16.66X_3 - 3.00X_4 - 4.52X_3^2 + 8.70X_1X_2[9]$$

$$Y_2 = 65.81 + 2.82X_1 + 16.82X_3 + 16.82X_3 - 3.38X_3^2[10]$$

Del análisis de varianza (ANOVA) utilizando el test de Fisher, se obtuvieron los valores de F para Novo435, de 6.57, con $p=0.0006$, y 27.85, y p menor a 0.0001, para CalB-MCI; en ambos casos significativos estadísticamente. Los valores de los coeficientes de correlación (R) y determinación (R^2) fueron elevados, 0.80 y 0.84, respectivamente, para Novo435; y 0.91 y 0.90 para CalB-MCI.

Los efectos de las variables en el modelo del diseño fueron analizados, siendo los efectos lineales de la variable X_3 (contenido de biocatalizador), y con valor positivo, los más importantes para ambos biocatalizadores; estos fueron 33.33 ($p=0.0002$), para Novo435, y 32.85 ($p=0.0001$) para CalB-MCI. En menor medida fueron también significativos, los efectos de la razón molar de sustrato (X_2) y la cantidad de agua (X_4), para Novo435, y la temperatura (X_1) para CalB-MCI. La mayor diferencia entre los biocatalizadores fue en el caso del efecto de la variable X_2 , cuya influencia era positiva para Novo435, y negativa, además de no ser significativa estadísticamente, para CalB-MCI.

Tabla 17. Matriz del diseño experimental y resultados experimentales para la conversión a butirato de etilo en 1h de reacción, para Novo435 y CalB-MCl. X_1 (temperatura, °C) X_2 (razón molar, etanol:butírico) X_3 (biocatalizador, %), X_4 (agua, %).

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	Rendimiento de esterificación, %	
					Novo435	CalB-MCl
1	-1	-1	-1	-1	37.6	43.9
2	-1	-1	-1	1	33.1	51.6
3	-1	-1	1	-1	67.7	78.4
4	-1	-1	1	1	67.6	79.1
5	-1	1	-1	-1	32.0	40.2
6	-1	1	-1	1	30.4	41.6
7	-1	1	1	-1	75.7	72.6
8	-1	1	1	1	74.8	75.4
9	1	-1	-1	-1	29.2	53.3
10	1	-1	-1	1	9.6	38.3
11	1	-1	1	-1	57.0	81.6
12	1	-1	1	1	45.7	78.6
13	1	1	-1	-1	66.1	52.5
14	1	1	-1	1	50.0	49.6
15	1	1	1	-1	87.7	80.0
16	1	1	1	1	84.0	83.2
17	-2	0	0	0	70.8	60.5
18	2	0	0	0	76.9	77.2
19	0	-2	0	0	66.9	76.0
20	0	2	0	0	64.6	64.8
21	0	0	-2	0	20.3	18.0
22	0	0	2	0	84.3	86.2
23	0	0	0	-2	68.2	72.5
24	0	0	0	2	61.0	54.6
25	0	0	0	0	66.4	64.7
26	0	0	0	0	59.3	62.9
27	0	0	0	0	68.5	58.4
28	0	0	0	0	66.9	65.6

6.2.2.2.2 Esterificación en condiciones óptimas.

La herramienta estadística Statistica 7.0 permitió el análisis del modelo para la obtención de las condiciones óptimas de operación para ambos biocatalizadores. Los valores óptimos para la conversión a butirato de etilo después de 1h de reacción, se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Valores óptimos para la conversión en 1h de reacción, para los biocatalizadores de CalB.

	Variable/valor óptimo	Novo435	CalB-MCI
x_1	Temperatura (°C)	37	44
x_2	Razón molar (etanol:butírico)	5:1	4:1
x_3	Cantidad de biocatalizador (%)	7.5	7.5
x_4	Cantidad de agua añadida (%)	0.25	0.25

Los valores de la conversión predichos por el modelo fueron superiores al 99%, mientras las conversiones mostradas de manera experimental fueron inferiores al 90%; los cursos de esterificación experimentales en las condiciones óptimas se representaron en la Figura 22.

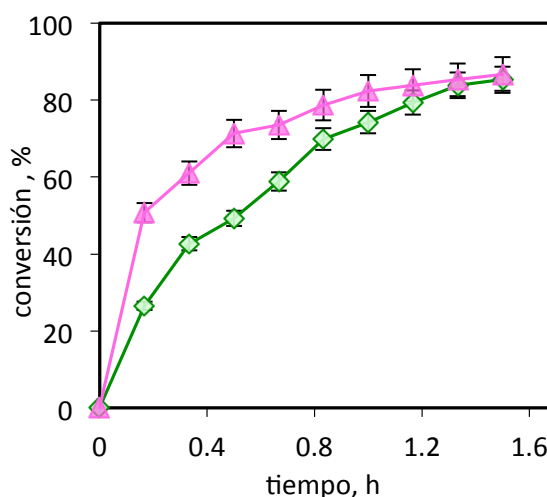


Figura 22. Curso de la esterificación en las condiciones óptimas propuestas por el modelo para los dos biocatalizadores de CalB. Novo435(rombos), temperatura 37°C, razón molar (etanol:butírico) 5:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua. CalB-MCI (triángulos), temperatura 44°C, razón molar (etanol:butírico) 4:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua.

6.2.2.2.3 Reutilización de los biocatalizadores.

Para evaluar la estabilidad operacional de los biocatalizadores de CalB en la síntesis del butirato de etilo, se llevaron a cabo sucesivos ciclos de esterificación con ambos biocatalizadores en las condiciones óptimas de reacción. Entre los ciclos los biocatalizadores fueron recuperados y filtrados para luego ser secados a 37°C durante la noche. Se comprobó la actividad de dos tipos de muestra por biocatalizador, aquellos que fueron simplemente filtrados, y los que fueron lavados con n-hexano. Los resultados de esta experimentación se recogen en la Figura 23.

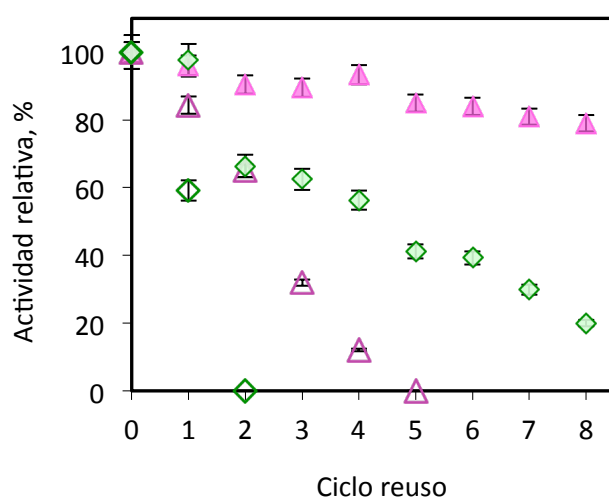


Figura 23. Estabilidad operacional de los biocatalizadores de CalB en sucesivos ciclos de esterificación. La síntesis del butirato de etilo tuvo lugar en condiciones óptimas Novo435(rombos), temperatura 37°C, razón molar (etanol:butírico) 5:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua. CalB-MCI (triángulos), temperatura 44°C, razón molar (etanol:butírico) 4:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua. Se distinguen las muestras tratadas con n-hexano (símbolos coloreados) y las muestras sin tratamiento (símbolos vacíos).

6.2.2.3 Comparación del nuevo biocatalizador TLL-MCI y el comercial, TL-IM en reacciones de esterificación.

Los biocatalizadores de la enzima TLL, TL-IM, y TLL-MCI se compararon en la síntesis del butirato de butilo. Se estudiaron las variables que afectan a la reacción de esterificación de manera sucesiva e independiente. Las variables estudiadas y los valores entre los que se estudió su efecto en la esterificación fueron, la temperatura, estudiada entre 30 y 60°C, la razón molar (alcohol:ácido), desde 1:1 a 1:5, el contenido de agua, de 0 a 1% y el contenido de biocatalizador, del 3 al 40% (las últimas variables referidas a la suma de las masas de ambos substratos, ácido butírico y n-butanol).

Para realizar una comparación previa de los dos biocatalizadores, se llevó a cabo la electroforesis de muestras de los biocatalizadores. La muestra del biocatalizador, TL-IM, fue tratada como se explicó en esta sección (5.1.2), donde el SDS del tampón de ruptura, con una concentración del 2%, es capaz de promover la desorción de la enzima del soporte. Sin embargo, el biocatalizador, TL-IM, está basado en una inmovilización por intercambio iónico, y la gran cantidad de carga catiónica del soporte y la carga aniónica de la enzima cubierta de SDS, podría producir la reinmovilización de la enzima, por lo que se propuso contrastar este efecto con una

alta fuerza iónica, añadiendo a la muestra una disolución de 1M de NaCl, mezclada con el tampón de ruptura.

En la figura de la electroforesis (Figura 24) se observa una banda más intensa en la muestra del biocatalizador preparado en el laboratorio, TLL-MCI, es decir una cantidad mayor de enzima presente en el biocatalizador (aparentemente el doble). Sin embargo, se comprobó que para alcanzar los mismos valores de conversión en el mismo tiempo, se necesitaba utilizar tres veces más cantidad de biocatalizador comercial, TL-IM, que de TLL-MCI, por lo que la actividad específica del nuevo biocatalizador, TLL-MCI, era un 50% mayor que para el biocatalizador comercial, en las condiciones de esterificación.

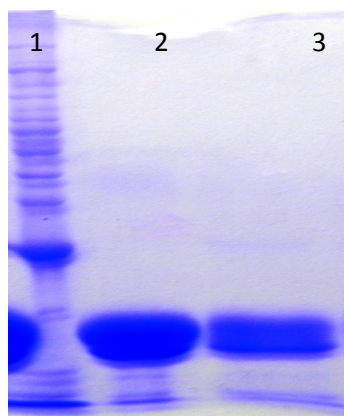


Figura 24. Electroforesis de los biocatalizadores de la enzima TLL. Canal 1: marcador de peso molecular, canal 2: TLL-MCI, canal 3 : TL-IM.

Se realizó un estudio del efecto de la presencia de concentraciones crecientes de ácido sobre la actividad de los biocatalizadores. Para ello se llevaron a cabo las reacciones de esterificación con concentraciones de ácido butírico de 0.1M a 1M. Los resultados revelaron valores de la velocidad inicial muy similares en ambos biocatalizadores hasta concentraciones de ácido de 0.5M (Figura 25 a). Para comprobar si la pérdida de actividad observada era debida a una distorsión de la estructura de la enzima, al descenso del pH del medio de reacción, a la inhibición por concentración de sustrato, o a la inactivación de la enzima, se realizaron una serie de experimentos, para ambos biocatalizadores, en los que se midió la concentración de producto con el tiempo a dos concentraciones de ácido diferentes, 0.5M y 1M, y se compararon las curvas (Figura 25 b).

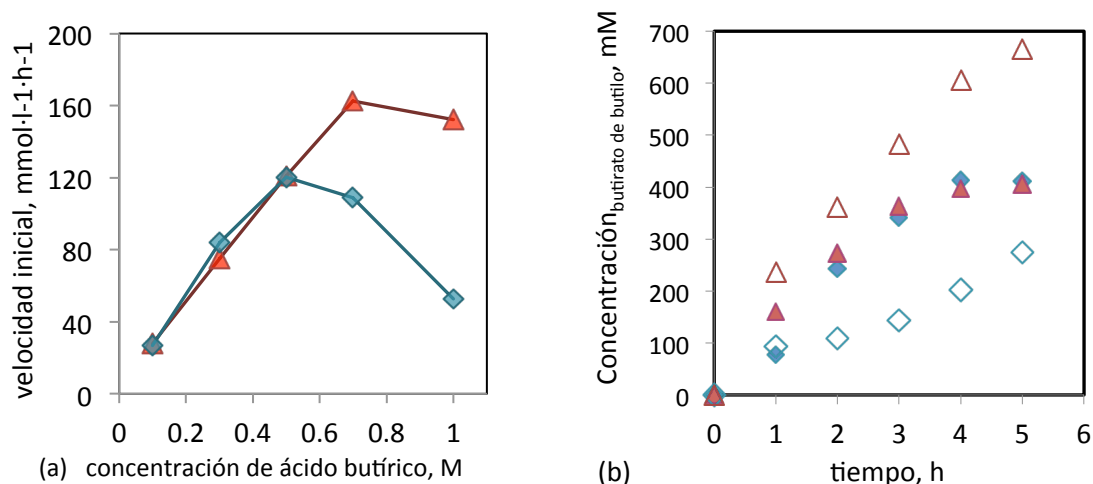


Figura 25. Efecto de la concentración de ácido butírico sobre la velocidad inicial de esterificación (a), TL-IM (rombos), TLL-MCI (triángulos) y, (b) sobre el curso de la reacción. TL-IM (rombos), TLL-MCI (triángulos). Símbolos abiertos 0.1M, y cerrados 0.5M de ácido butírico.

Se escogió una concentración de ácido de 0.7M para ambos biocatalizadores para realizar el resto de experimentos.

6.2.2.3.1 Efecto de la razón molar de sustrato sobre la actividad de esterificación.

En estos experimentos se han considerado valores fijos de la cantidad de biocatalizador utilizada, de acuerdo con las observaciones previas, donde se indicó una actividad específica de TLL-MCI dos veces mayor a la observada para TL-IM en reacciones de esterificación. Por tanto se utilizaron, un 30% del biocatalizador TL-IM, y un 10% de TLL-MCI (referida a la suma de las masas de sustrato en relación estequiométrica).

El resto de las variables fueron las siguientes: la concentración de ambos sustratos 0.7M, un 0% de agua inicial, y la temperatura, 30°C.

La razón molar se ajustó a valores entre 1:1 y 4:1; los resultados se muestran en la Figura 26, donde se calculó la velocidad inicial de la reacción de esterificación de ambos biocatalizadores.

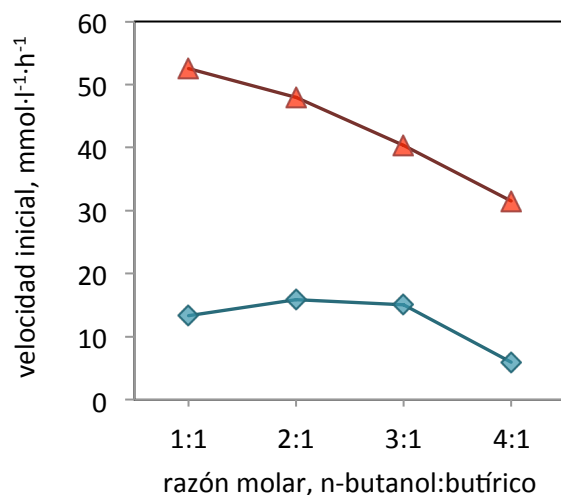


Figura 26. Velocidad inicial de la esterificación del butirato de butilo en función de la razón molar de los substratos (n-butanol: ácido butírico). Reacción con, una cantidad de biocatalizador de 30% para TL-IM, y un 10% para TLL-MCI (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica); una concentración de ambos substratos 0.7M y 30°C. TLL-MCI (triángulos), TL-IM (rombos).

Se escogieron como óptimos para los siguientes experimentos los valores de la razón molar de , 2:1 para TL-IM, y la razón estequiométrica 1:1 para TLL-MCI.

6.2.2.3.2 Efecto de la cantidad de agua añadida en la actividad de esterificación.

El efecto del agua añadida se estudió para la reacción de esterificación en ambos biocatalizadores, variando entre 0 y 1% respecto a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica. Otras variables fueron las indicadas en la Figura 27.

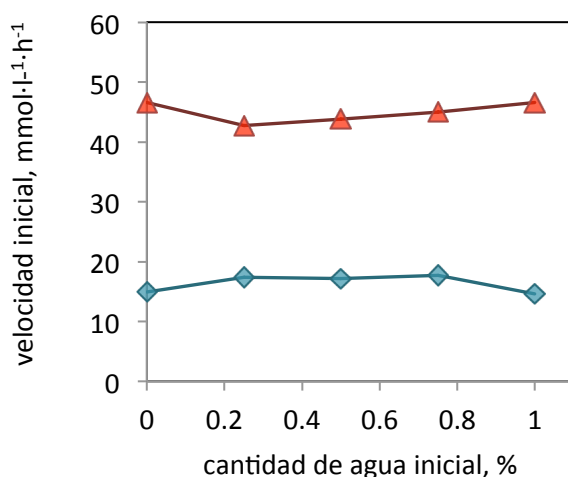


Figura 27. Efecto de la cantidad de agua añadida en la velocidad inicial de esterificación de los biocatalizadores: TL-IM (rombos), y TLL-MCI (triángulos). Las condiciones de reacción fueron: concentración de ambos substratos 0.7M, temperatura 30°C, razón molar (n-butanol:ácido butírico) 2:1 para TL-IM, y 1:1 para TLL-MCI. La cantidad de biocatalizador fue, 30% para TL-IM, y un 10% para TLL-MCI (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica).

Dado que el efecto sobre la velocidad inicial de la cantidad de agua, no es muy importante en los niveles estudiados, se decidió no añadir agua en el caso del biocatalizador TLL-MCI, y utilizar únicamente un 0.25% en el caso del biocatalizador TL-IM, ya que en este último el efecto al añadir agua era levemente positivo.

6.2.2.3.3 Efecto de la temperatura en la actividad de esterificación.

La temperatura se estudio en un intervalo entre 30 y 60°C. El resto de las variables se fijaron en los valores anteriormente mencionados, las tendencias de ambos biocatalizadores en cuanto a su velocidad inicial frente a la temperatura se recogen en la Figura 28.

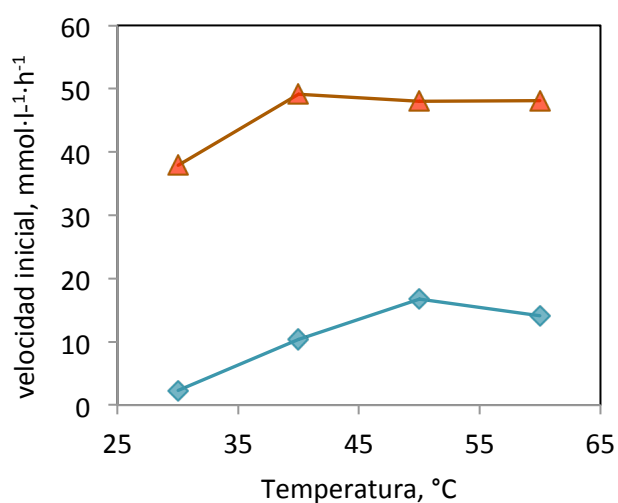


Figura 28. Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de la esterificación para los dos biocatalizadores. Condiciones de reacción: concentración de ambos substratos 0.7M, TL-IM (rombos), 2:1 (n-butanol:ácido butírico), 30% cantidad de biocatalizador y 0.25% de agua (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica). TLL-MCI (círculos), razón molar 1:1, cantidad de biocatalizador 10%, y 0% de agua.

Se escogió una temperatura de 50°C como valor óptimo de la variable para los siguientes ensayos, en ambos biocatalizadores de la enzima TLL.

6.2.2.3.4 Efecto de la cantidad de biocatalizador en la velocidad inicial de reacción.

La última variable que se estudió fue la cantidad de biocatalizador utilizada, referida al porcentaje de la suma de la masa de ácido y alcohol en relación estequiométrica. Esta variable se estudio en diferentes intervalos, teniendo en cuenta la carga de los biocatalizadores y su actividad específica. Para TLL-MCI se trabajó entre un 5 y un 15% de biocatalizador, y para TL-IM, entre un 5 y un 40% (como se indicó antes, TLL-MCI tiene una actividad específica el doble que TL-IM).

En la Figura 29 se han representado los resultados del experimento en función de la velocidad inicial de esterificación.

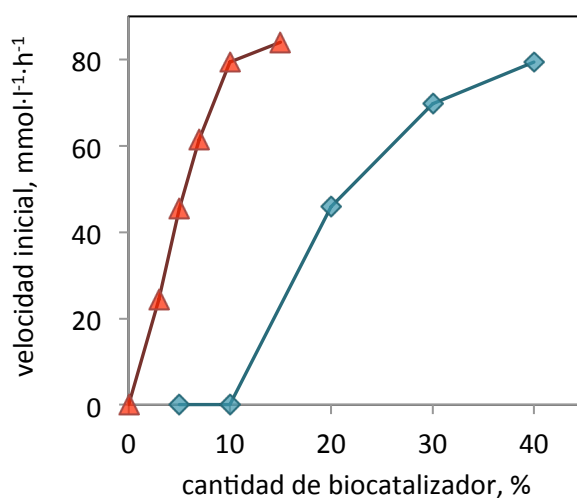


Figura 29. Efecto de la cantidad de biocatalizador sobre la esterificación. El porcentaje de biocatalizador está referido a la suma de los sustratos en relación estequiométrica. Las condiciones de operación fueron: concentración de ambos sustratos 0.7M, temperatura 50°C. TL-IM (rombos), 2:1 (n-butanol: ácido butírico), 0.25% de agua (referido a la suma de las masas de los sustratos en relación estequiométrica). TLL-MCI (círculos), razón molar 1:1, y 0% de agua.

Según los resultados observados se eligieron concentraciones óptimas de biocatalizador del 10% para TLL-MCI y del 30% para TL-IM.

6.2.2.3.5 Esterificación en condiciones óptimas.

Una vez optimizadas las variables de reacción, se realizó un nuevo experimento donde se comparó el curso de la esterificación para ambos biocatalizadores. En la Figura 30 se muestra la conversión del butirato de butilo en condiciones óptimas hasta más de las ocho horas de reacción.

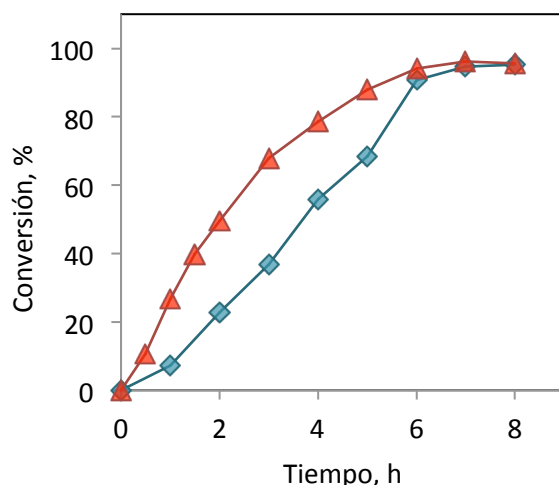


Figura 30 Curso de la síntesis del butirato de butilo bajo condiciones óptimas para ambos biocatalizadores: concentración de ambos sustratos 0.7M, temperatura 50°C. TL-IM (rombos), 2:1 (n-butanol: ácido butírico), 0.25% de agua, 40% de biocatalizador (referido a la suma de las masas de los sustratos en relación estequiométrica). TLL-MCI (círculos), razón molar 1:1, y 0% de agua, 10% de biocatalizador.

6.3 Esterificación mediante agitación por ultrasonidos.

6.3.1 Esterificación catalizada por CalB mediante agitación por ultrasonidos.

En las secciones anteriores se estudió la esterificación bajo agitación mecánica, se analizaron las variables de reacción y evaluaron la actividad operacional bajo las condiciones óptimas seleccionadas. En este apartado se mostrarán igualmente los resultados de la optimización bajo agitación por ultrasonidos. Se trabajó con el biocatalizador CalB-MCI en la esterificación del ácido acético y el alcohol butílico.

6.3.1.1 Diseño experimental.

El diseño experimental se planteó para evaluar el efecto sobre la velocidad inicial de la esterificación, de cuatro variables: la temperatura (X_1), la razón molar de los sustratos (X_2), la cantidad de biocatalizador usada (X_3), y la cantidad de agua añadida (X_4). Se utilizó un diseño central compuesto con 27 experimentos (tres repeticiones en el punto central). En la Tabla 19 se presenta en la matriz de diseño, el conjunto de los experimentos llevados a cabo, con los resultados de la respuesta. Los valores de los niveles de cada variable se muestran en la Tabla 20.

Tabla 19. Matriz del diseño de la esterificación del ácido acético y el n-butanol catalizada por el biocatalizador preparado CalB-MCI con ultrasonidos. La concentración inicial de sustrato fue 0.3M.

Experimento	X_1	X_2	X_3	X_4	Velocidad inicial (mmol/l·h)
-------------	-------	-------	-------	-------	------------------------------

					Novo435
1	-1	-1	-1	-1	114.78
2	-1	-1	-1	1	92.93
3	-1	-1	1	-1	81.07
4	-1	-1	1	1	195.08
5	-1	1	-1	-1	82.18
6	-1	1	-1	1	98.19
7	-1	1	1	-1	223.66
8	-1	1	1	1	219.88
9	1	-1	-1	-1	202.05
10	1	-1	-1	1	146.19
11	1	-1	1	-1	264.04
12	1	-1	1	1	256.23
13	1	1	-1	-1	169.61
14	1	1	-1	1	99.88
15	1	1	1	-1	241.48
16	1	1	1	1	199.36
17	-2	0	0	0	140.41
18	2	0	0	0	143.91
19	0	-2	0	0	184.91
20	0	2	0	0	209.32
21	0	0	-2	0	44.47
22	0	0	2	0	273.94
23	0	0	0	-2	231.62
24	0	0	0	2	240.28
25	0	0	0	0	239.99
26	0	0	0	0	234.81
27	0	0	0	0	232.12

Tabla 20. Valores de las variables del diseño en cada nivel de codificación. En el contenido de biocatalizador y de agua, el porcentaje está referido a la suma estequiométrica de ácido acético y de n-butanol.

Variable/valores codificados	-2	-1	0	1	2
x_1 (temperatura, °C)	30	37.5	45	52.5	60
x_2 (razón molar, n-butanol:acético)	1:1	2:1	3:1	4:1	5:1
x_3 (biocatalizador, %)	1	2.5	5	7.5	10

x_4 (agua, %)	0	0.25	0.5	0.75	1
-----------------	---	------	-----	------	---

La ecuación que representa la correlación entre los datos experimentales y los predichos por el modelo se muestra a continuación (ecuación [11]):

$$Y = 232.46 + 19.91X_1 - 25.19X_1^2 - 11.45X_2^2 + 47.24X_3 - 20.92X_3^2 - 2.24X_4 + 18.63X_1X_2 - 17.49X_1X_4 + 12.13X_2X_3 - 8.00X_2X_4 - 11.98X_3X_4 \quad [11]$$

El modelo es estadísticamente significativo para representar los datos experimentales, esta información fue obtenida gracias al análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con el test de Fisher (valor de $F=6.51$, y p muy bajo, $p=0.0012$). Los coeficientes de ajuste fueron $R=0.88$ y $R^2=0.94$.

Los efectos lineales de las variables fueron estadísticamente significativos en un nivel de confianza del 95% salvo la variable correspondiente a la razón molar (con valor del efecto de 2.5); los valores de los efectos fueron 39.9 para la temperatura, 94.5 para el contenido de biocatalizador, y -4.5 para la cantidad de agua inicial. Los primeros presentan un gran influencia, y el contenido de agua tiene un efecto negativo sobre la velocidad inicial de reacción.

A partir del análisis de la ecuación de ajuste usando la herramienta Statistica 7.0, se obtuvieron las condiciones óptimas para la síntesis del acetato de butilo catalizada por CalB-MCI. Sin embargo, se propusieron otras condiciones óptimas, considerando los efectos lineales sobre la respuesta, donde se indicó una influencia negativa del contenido de agua en el medio, por lo que se propone no usar agua, y un efecto no significativo de la razón molar, por lo que se eligió utilizar la razón estequiométrica (1:1); la condición óptima propuesta por el análisis con Statistica 7.0, se denominó óptimo I, y la propuesta por el análisis de los efectos lineales, óptimo II. Estos valores se recogieron en la Tabla 21.

Tabla 21. Valores óptimos de las variables de operación para la síntesis de acetato de butilo catalizada por CalB-MCI. Óptimo I (análisis estadístico), óptimo II (análisis de efectos lineales).

Valor óptimo/ biocatalizador	Óptimo I	Óptimo II
x_1 (temperatura, °C)	48.8	60
x_2 (razón molar, n-butanol:acético)	3.46:1	1:1
x_3 (biocatalizador, %)	7.5	5
x_4 (agua, %)	0.28	0

6.3.1.2 Esterificación en condiciones óptimas.

Se llevaron a cabo dos experimentos utilizando una concentración de ácido de 0.3M, para las dos condiciones óptimas descritas anteriormente (Tabla 21). Los cursos de la esterificación se han representado en la Figura 31

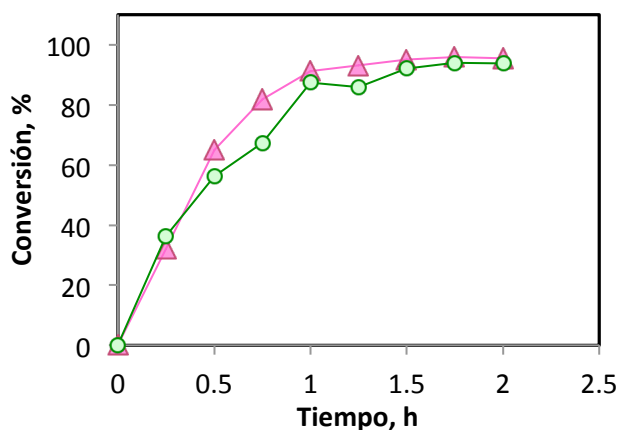


Figura 31. Esterificación del ácido acético y el n-butanol catalizada por CalB-MCI con agitación por ultrasonidos. Se utilizó 0.3M de ácido en ambos experimentos. Condiciones: óptimo I (triángulos), 48.8°C, razón molar 3.46:1, 7.5% biocatalizador, y 0.28% de agua (suma de las masas de sustrato sobre razón estequiométrica). Óptimo II (círculos), 60°C, razón molar 1:1, 5% biocatalizador, y 0% de agua.

6.3.1.3 Reutilización del biocatalizador.

Una vez conocida la conversión de la reacción bajo condiciones óptimas, es importante evaluar la estabilidad operativa del biocatalizador en agitación por ultrasonidos. Para ello se evaluó la actividad de esterificación relativa al valor inicial, en sucesivos ciclos de reacción. En la Figura 32 se han representado los valores de la actividad relativa para siete ciclos de reacción, en las condiciones óptimas I y II.

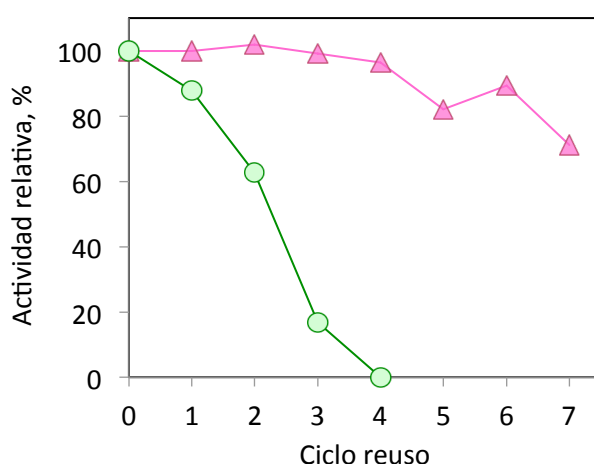


Figura 32. Estabilidad operacional del biocatalizador CalB-MCI en sucesivos ciclos de esterificación, bajo las condiciones óptimas. Se utilizó 0.3M de ácido en ambos experimentos. Óptimo I (triángulos), 48.8°C, razón molar 3.46:1, 7.5% biocatalizador, y 0.28% de agua (suma de las masas de sustrato sobre razón estequiométrica). Óptimo II (círculos), 60°C, razón molar 1:1, 5% biocatalizador, y 0% de agua.

6.3.1.4 Efecto de la concentración de ácido sobre la actividad de esterificación.

Una de las ventajas del uso de ultrasonidos descrita para Novo435 es la posibilidad de utilizar mayor concentración de ácido (Martins, B. A., y col., 2013b). Para CalB-MCI se utilizaron concentraciones hasta 2M de ácido acético. En la Figura 33 se ha representado la conversión de la esterificación bajo las condiciones óptimas I, y dos niveles de concentración de ácido.

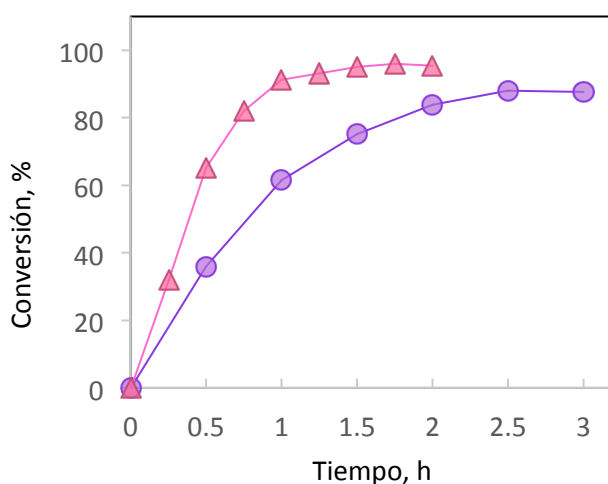


Figura 33. Efecto de la concentración de ácido sobre el curso de la esterificación catalizada por CalB-MCI. Las condiciones fueron 48.8°C, razón molar 3.46:1, 7.5% biocatalizador, y 0.28% de agua (suma de las masas de sustrato sobre razón estequiométrica). Concentración de ácido 0.3M (triángulos), 2M (círculos).

A modo de resumen, en la Tabla 22 se recogen los datos de la síntesis de acetato de butilo de los biocatalizadores de CalB, Novo435 y CalB-MCI, utilizando agitación mecánica y agitación mediante ultrasonidos de baja frecuencia.

Tabla 22. Comparación de las condiciones de operación óptimas y resultados de la síntesis del acetato de butilo catalizada por los biocatalizadores de CalB, Novo435 y CalB-MCI. *Datos tomados del artículo Martins A.B. y col. 2013b.

Biocatalizador	Agitación mecánica		Agitación por ultrasonidos	
	Novo435*	CalB-MCI	Novo435*	CalB-MCI
T(°C)	40	40	46	48.8
Razón molar (butanol: ácido acético)	3:1	5:1	3.6:1	3.46:1
Biocatalizador (%)	7.5	10	7	7.5
Agua añadida (%)	0.25	0.4	0.25	0.28
Ácido acético (M)	0.3	0.3	2	2
Conversión 2.5h (%)	91	90 (2h)	84	90
Productividad (mmol/l·h)	115	220	800	840
Nº reusos (% actividad conservada)	2 (0)	6 (70)	14 (70)	7 (70)

7 DISCUSIÓN

7.1 Preparación de biocatalizadores en soportes hidrofóbicos.

El soporte basado en una resina de poli-estireno-divinilbenceno se propuso como un nuevo material alternativo para la inmovilización de lipasas. Los biocatalizadores preparados a partir del nuevo material fueron comparados con otros soportes ya utilizados, y descritos en bibliografía, como soportes adecuados para la inmovilización de lipasas (Palomo J.M. y col. 2002b) , y otros biocatalizadores comerciales preparados industrialmente.

7.1.1 Biocatalizadores de CalB.

Los biocatalizadores de CalB estudiados fueron: Los preparados en el laboratorio, CalB-C18 como biocatalizador de referencia; y CalB-Diaion y CalB-MCI, biocatalizadores preparados a partir de soportes de resina de poli-estireno-divinilbenceno. También, el biocatalizador comercial de CalB, Novo435.

7.1.1.1 Inmovilización y capacidad de carga

En la Figura 3 se mostró el curso de la inmovilización de la enzima CalB en los soportes MCI, Diaion y C18. En todos los casos la inmovilización es prácticamente total después de 12 horas, siendo especialmente rápida la inmovilización en el soporte MCI, cuya actividad residual no pudo ser detectada después de las dos horas; siendo la inmovilización de CalB en MCI, 4 veces más rápida que en el soporte Diaion, y alrededor de 6 veces más que el soporte C18.

En cuanto a la capacidad de carga, los valores recogidos en la Tabla 1 muestran que el soporte MCI permite la inmovilización de 113 mg de enzima por gramo de soporte, lo que supone el doble de la cantidad de enzima que es posible inmovilizar en los otros soportes, Diaion y C18.

La diferencia en la inmovilización de CalB en los soportes MCI y C18 reside en las distintas áreas específicas de los dos materiales. Los soportes basados en una resina de poli-estireno-divinilbenceno, Diaion y MCI, tienen un área específica similar, entre 500 y 600 m²/g, pero se diferencian en el tamaño de poro, siendo para Diaion menor que para MCI (200-300Å frente a 400-600Å); en el caso de Diaion los poros de menor tamaños podrían estar bloqueados después de la inmovilización en las zonas de mayor accesibilidad por lo que estas zonas internas quedarían inaccesibles para la enzima.

7.1.1.2 Evaluación de la actividad frente a agentes inactivantes.

7.1.1.2.1 Estabilidad térmica.

En principio los biocatalizadores fueron incubados a 45°C; a esta temperatura todos conservaron el 90% de la actividad inicial, después de 24h, por lo que se incrementó la temperatura hasta los 60°C. A una temperatura de 60°C, es posible observar las diferencias en la estabilidad térmica de los biocatalizadores de CalB. En la Figura 4 se observa que el biocatalizador más estable es CalB-C18, siendo alrededor de 50 veces menos estable que éste y el menos estable de todos, el biocatalizador CalB-MCI. Entre estos dos biocatalizadores, los soportes, ambas resinas de poli-estireno-divinil benceno, se diferencian en el grado de polimerización de la resina, lo que afecta a la hidrofobicidad global del material. De manera general, cuando una enzima se inmoviliza en un soporte hidrofóbico, se producen cambios que afectan a su estabilidad, tal que quedan expuestos residuos hidrofóbicos internos estabilizados por la superficie hidrofóbica, y al producirse las vibraciones provocadas por el aumento de temperatura pueden desestabilizarse (Sandwick R.K. y col. 1987; Fernández-Lorente G. y col. 2008).

7.1.1.2.2 Incubación en acetonitrilo.

Según se observa en la Figura 5, el biocatalizador menos estable en la disolución al 50% de acetonitrilo fue Novo435, con un 15% de actividad residual a las 5h mientras que el resto de los biocatalizadores preparados conservaban más del 80%. Estos resultados introducen una ventaja de los biocatalizadores preparados en soportes hidrofóbicos, en poli-estireno-divinilbenceno, frente al biocatalizador comercial, Novo435, para sus posibles aplicaciones en medios donde se trabaja con disolventes orgánicos.

7.1.1.3 Efecto de la inmovilización de CalB en su actividad y especificidad.

Para evitar los efectos del posible impedimento difusional debido al tamaño de partícula de los diferentes soportes, se prepararon biocatalizadores con carga enzimática de 2, 10 y 20mg_{enzima}/g_{soporte}; no se observaron diferencias significativas entre las muestras con diferentes cargas por lo que se supuso que el tamaño de partícula no influye en los resultados de actividad.

De los resultados de la actividad de los biocatalizadores de CalB frente a diferentes sustratos, se puede observar en la Tabla 2, que el biocatalizador con mayor actividad frente a todos los sustratos es CalB-MCI; el siguiente más activo depende del sustrato: para el acetato

de butilo y la triacetina, CalB-C18 es más activo que CalB-Diaion; y para el D,L-mandelato de metilo, CalB-Diaion es casi el doble más activo que CalB-C18.

En cuanto a la actividad por gramo de biocatalizador (Tabla 3), para CalB-MCI, se suma el hecho de poseer mayor actividad específica para todos los sustratos y una alta capacidad de carga, superando hasta en 8 veces los valores de actividad del biocatalizador comercial Novo435.

Los biocatalizadores de los soportes C18 y Diaion superan también al biocatalizador comercial, en todos los sustratos, en el caso de CalB-C18 y, para CalB-Diaion, supera los valores de actividad de Novo435 salvo para la triacetina, mostrando un ejemplo de la modulación de la especificidad de la enzima mediante la inmovilización (Cabrera Z. y col. 2009).

Las diferencias entre los dos biocatalizadores con soportes de poli-estireno-divinilbenceno, MCI y Diaion, reside en el tamaño de poro, siendo en el caso del soporte Diaion menor el tamaño de los poros; este hecho debe afectar a la difusión de los sustratos a través de la matriz del soporte, de ahí las posibles diferencias.

7.1.1 Biocatalizadores de TLL, RML y Lecitasa.

La lipasa TLL se ha utilizado en la industria alimentaria, en la producción de biodiesel y en química fina (Fernández-Lafuente, 2010). Junto con la producción de biodiesel, la lipasa RML, tiene otras aplicaciones desarrolladas en diferentes campos, entre ellos la producción de sabores alimentarios y aromas para la industria alimentaria y la producción de fragancias (Rodrigues R.C. y col. 2010a, Rodrigues R.C. y col. 2010b). La enzima Lecitase® Ultra, a pesar de ser una fosfolipasa, es también capaz de inmovilizarse por activación interfacial a soportes hidrofóbicos como ocurre en las lipasas. Ésta, ha sido obtenida al fusionar genes de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* y la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum*. Lecitase® Ultra se ha utilizado para aumentar el rendimiento en el proceso de eliminación de las gomas presentes como impurezas en los aceites usados, por ejemplo, para la producción de biodiesel (Fernández-Lorente G. y col. 2007b).

Estas enzimas se inmovilizaron vía activación interfacial en dos soportes hidrofóbicos diferentes, octyl, y MCI. Se obtuvieron los biocatalizadores, TLL-MCI, TLL-octyl, RML-MCI, RML-octyl, Le-MCI, y Le-octyl estos fueron caracterizados en cuanto a su estabilidad y su especificidad en diferentes reacciones de hidrólisis junto con el biocatalizador comercial correspondiente, si estaba disponible.

7.1.1.1 Inmovilización y capacidad de carga.

En la Figura 6 se muestra el curso de la inmovilización de las enzimas en los soportes MCI y octyl. En ambos soportes el tipo de inmovilización es el mismo, mediante interacciones hidrofóbicas gracias al mecanismo de activación hidrofóbica. La diferencia entre los dos soportes reside en su hidrofobicidad, siendo MCI un soporte más hidrofóbico que octyl; el primero tiene una estructura polimérica totalmente hidrofóbica, mientras octyl está compuesto por una capa hidrofóbica dispuesta sobre otra capa hidrofílica. En todos los casos la velocidad de inmovilización fue más rápida para el soporte MCI; la actividad en el sobrenadante fue prácticamente inapreciable en la primera medida (30 minutos), mientras la inmovilización con el soporte octyl se extendió hasta las 24-30h. En el caso de la enzima RML, la diferencia entre la inmovilización en los dos soportes es muy leve, mientras en TLL y Lecitasa, es posible apreciar la caída en la actividad del biocatalizador inmovilizado en octyl de manera más lenta que en MCI.

La capacidad de carga de los biocatalizadores se recogió en la Tabla 4. Se observa un factor de hasta 30 veces mayor capacidad de carga para el nuevo soporte MCI que para octyl.

7.1.1.2 Evaluación de la actividad frente a agentes inactivantes.

7.1.1.2.1 Estabilidad térmica.

En el estudio de la estabilidad térmica de los biocatalizadores se obtuvieron los valores de las vidas medias; se puede observar en la Tabla 5 el efecto negativo sobre la estabilidad térmica de la inmovilización de las enzimas en el nuevo soporte MCI, comparada con los biocatalizadores de octyl. Cuando el pH es 8.5, la diferencia en las vidas medias es menor entre los biocatalizadores de los dos soportes, en el caso de las enzimas RML y Lecitasa. El biocatalizador con mayor estabilidad térmica a todos los valores de pH resultó ser TLL-octyl, con una diferencia de estabilidad tan importante respecto a TLL-MCI que no es posible comparar los valores de vida media.

El efecto de la inmovilización de las enzimas en el soporte MCI fue igualmente negativo al preparar el biocatalizador CalB-MCI, como se comprobó en la Figura 4, en la que se tiene una vida media comparable a la del biocatalizador RML-MCI pero habiendo sido incubada a 60°C, en vez de a los 50°C de RML; así, CalB-MCI presenta la mayor estabilidad térmica entre todos los biocatalizadores preparados utilizando el nuevo soporte MCI, sin embargo, todavía mucho menor que las estabilidades de los demás biocatalizadores. El efecto negativo se explicó anteriormente

para CalB, y está basado en la naturaleza altamente hidrofóbica del soporte, capaz de estabilizar estructuras parcialmente desempaquetadas de la enzima que se ven afectadas con las vibraciones que producen el aumento de temperatura (Hernández K. y col. 2011c).

7.1.1.2.2 Incubación en acetonitrilo.

Los cursos de la incubación se mostraron en Figura 7, para los biocatalizadores de las tres enzimas. Para TLL, tanto el biocatalizador TLL-MCI como TLL-octyl se mostraron muy estables incluso a altas concentraciones de acetonitrilo (80%); se observó un incremento de la actividad de ambos biocatalizadores con la incubación en el disolvente, siendo más significativo para el biocatalizador del nuevo soporte MCI (después de una semana la actividad de TLL-MCI es 8 veces mayor que la inicial, mientras para TLL-octyl se conserva el 90% de la actividad inicial).

En el caso de RML, el efecto de la incubación en acetonitrilo es diferente, produciendo una pérdida de la actividad, respecto al valor inicial, con sólo un 30% de concentración del disolvente orgánico. El efecto de la incubación en acetonitrilo es, de nuevo, más perjudicial para el biocatalizador inmovilizado en octyl que para RML-MCI (Figura 7b), lo que se puede deducir de sus vidas medias, 0.5h para RML-octyl, y alrededor de 15h para RML-MCI .

Finalmente, para Lecitasa, ambos biocatalizadores incubados en un 50% de acetonitrilo, presentaron una tendencia similar, inactivándose progresivamente. Al ser incubados en un 30% de acetonitrilo (Figura 7c), se observó un incremento inicial de la actividad para Le-MCI para luego caer progresivamente y presentar una tendencia similar al biocatalizador Le-octyl en la caída de la actividad.

La mayor estabilidad de los biocatalizadores inmovilizados en el soporte de poli-estireno-divinilbenceno, MCI, se podría explicar por existir una mayor fortaleza de las interacciones entre la enzima y el soporte en el medio orgánico, sin ser promovida, en las concentraciones de trabajo, la ruptura de estas interacciones. El incremento inicial de la actividad en TLL y Lecitasa, puede ser la consecuencia de existir fuertes interacciones entre la enzima y el soporte, lo que va a promover un posible bloqueo parcial del centro activo; con la presencia del disolvente orgánico, se produciría una relajación de estas interacciones, y de ahí el centro activo quedaría más accesible, produciéndose el incremento de la actividad observado. Sin embargo, no pueden ser descartados los cambios directos en la estructura de las enzimas que causen este comportamiento (Rodrigues, C. R., y col., 2013).

7.1.1.2.3 Medida de la actividad a diferentes valores de pH.

En la Tabla 6 se muestra la actividad frente a p-NPB de las suspensiones de los biocatalizadores, con 3mg/g, resuspendidos en disoluciones con diferentes valores de pH.

Después de la inmovilización, al resuspender las muestras de biocatalizador, se pudo comprobar que todos los biocatalizadores preparados a partir del soporte octyl, expresaban una actividad en p-NPB superior a la de la enzima soluble, es decir, la enzima inmovilizada en octyl está hiperactivada. Este hecho no se vio reflejado en los biocatalizadores preparados a partir del nuevo material MCI. Los valores de la Tabla 6 recogen esta tendencia, donde se pueden observar valores de la actividad específica en p-NPB hasta 20 veces mayores para RML-octyl que para el biocatalizador RML-MCI, y de 100 veces mayor para Le-octyl que para Le-MCI; en el caso de la enzima TLL también existen diferencias entre los valores de actividad de ambos biocatalizadores, pero la diferencia es algo menor.

Sin embargo, para el caso de las enzimas de RML y TLL, la tendencia de la actividad con los valores de pH fue similar, mostrando los mayores valores de actividad para un mismo pH. Esto no se cumplió para los biocatalizadores de la enzima Lecitasa, donde el óptimo de actividad para Le-octyl fue pH 10, y el de Le-MCI, pH 6.

Aunque el mecanismo de inmovilización para ambos soportes es el mismo, la diferencia en hidrofobicidad, y morfología interna, puede ser la causa de los diferentes comportamientos observados (Fernández-Lorente G. y col. 2007a).

A la vista de estos resultados se podría concluir que el nuevo soporte MCI no es adecuado para inmovilizar lipasas si el soporte utilizado es p-NPB. Para comprobar si ésta es la tendencia general en la comparación de los dos biocatalizadores, se utilizaron diferentes sustratos cuyos valores de actividad, en diferentes condiciones de análisis, se muestran a continuación.

7.1.1.3 Efecto de la inmovilización de las enzimas en su actividad y especificidad.

Para estudiar la actividad y la especificidad de los biocatalizadores, se evaluaron reacciones de hidrólisis con tres sustratos que presentan diferentes propiedades en cuanto al tamaño, el carácter alifático o aromático, y la polaridad (Figura 1 y Figura 2). Los resultados se recogieron en la Tabla 7 y en la Tabla 8, en esta última se recogen los resultados de la actividad de los biocatalizadores del nuevo soporte MCI y el comercial, para las enzimas TLL y RML.

Los resultados mostrados para TLL indican una mayor actividad del biocatalizador TLL-octyl que el preparado en el nuevo soporte, para valores de pH 5, hasta 4 veces mayor, y para pH 7, hasta 7 veces. A pH 8.5 los valores de las actividades fueron más parecidos para el hexanoato de etilo y 3 veces superior para el biocatalizador de octyl en fenilacetato de metilo. Sin embargo, para uno de los sustratos, el D,L-mandelato de metilo, el biocatalizador TLL-MCI fue más activo a todos los valores de pH, con una diferencia máxima a pH 8.5, siendo cerca de 6 veces más activo el nuevo biocatalizador que el inmovilizado en octyl.

La actividad por gramo de biocatalizador de TLL-MCI fue superior a la del biocatalizador comercial para todos los sustratos, a los tres valores de pH. Se obtuvieron diferencias en la actividad por gramo, a favor del biocatalizador TLL-MCI de hasta 90 veces a pH 5 y 7 y de 250 veces a pH 8.5, para el sustrato D,L-mandelato de metilo.

En el caso de la enzima RML, la inmovilización en el nuevo soporte, MCI, produjo un importante caída de la actividad con el sustrato, hexanoato de etilo a pH 7 (siendo el biocatalizador RML-octyl 35 veces más activo), mientras que a pH 8.5 la actividad de RML-MCI fue 2 veces mayor. Para el sustrato fenilacetato de metilo las actividades fueron las más bajas de los tres sustratos, estando en el caso del soporte de octyl, fuera del límite de detección a pH 8.5. Usando el sustrato más complejo, D,L-mandelato de metilo, los valores de actividad fueron superiores usando el biocatalizador preparado con el nuevo soporte, RML-MCI (hasta una diferencia de 30 veces a pH 7).

Los datos más destacados fueron observados al comparar el biocatalizador preparado con el comercial, siendo la actividad por gramo de biocatalizador superior para el nuevo soporte MCI, para dos de los sustratos; la tendencia se invierte con el sustrato fenilacetato de metilo, con diferencias de hasta 2000 veces a pH 5; solamente con a favor del biocatalizador comercial.

La actividad de los biocatalizadores de Lecitasa es mayor para el biocatalizador del nuevo soporte, MCI, en los tres sustratos. Con hexanoato de etilo, la diferencia en la actividad fue de 800 veces a pH 5 y 3000 veces para pH 8.5. En el caso del fenilacetato de metilo, la actividad para el biocatalizador inmovilizado en octyl, no pudo ser detectada, mientras que para Le-MCI la actividad fue 10 veces menor que la medida para el hexanoato de etilo.

En resumen, se puede establecer que los soportes basados en resinas de poli-estireno-divinilbenceno, son materiales adecuados para la inmovilización de las enzimas estudiadas. Estos

materiales son baratos, la inmovilización es rápida, y se obtienen altos valores de la capacidad de carga.

Aunque todos los biocatalizadores preparados en el laboratorio siguen un mismo mecanismo de inmovilización, los resultados fueron muy diferentes. Las diferencias mostradas entre los diferentes biocatalizadores preparados debe residir en las diferencias en la estructura interna y en la composición del soporte; esto se traduce en distintas conformaciones que la enzima inmovilizada adopta, con su forma abierta estabilizada en una estructura determinada.

Para CalB, comparados con los resultados para biocatalizadores basados en soportes ya descritos para la inmovilización de lipasas, como es el caso de C18; se consiguen valores superiores de la actividad de la enzima inmovilizada en reacciones de hidrólisis. Además, se observó un aumento de la actividad entre 6 y 8 veces comparada con la actividad del biocatalizador comercial Novo435.

En cuanto al resto de las enzimas estudiadas, se obtuvieron resultados muy dispares. Entre los dos tipos de biocatalizadores preparados, por inmovilización en octyl o en MCI, con unos substratos se observan actividades mayores para los biocatalizadores del soporte MCI, mientras que con otros la actividad es mayor para los inmovilizados en octyl.

En el estudio de la estabilidad, los dos biocatalizadores basados en la resina poli-estireno-divinilbenceno presentan una clara ventaja para su utilización en medios orgánicos. Sin embargo, la estabilidad térmica es menor al resto de los biocatalizadores utilizados como referencia.

7.2 Biotransformaciones

Para implantar la ejecución de procesos de transesterificación y esterificación mediante biocatálisis es necesario desarrollar biocatalizadores competitivos a nivel industrial que salven los problemas habituales como la estabilidad y precio. Las ventajas de estos procesos mediante biocatálisis, como el menor consumo de energía, y etapas de purificación de los productos más sencillas, invitan al estudio y desarrollo de biocatalizadores competitivos.

7.2.1 Transesterificación.

En esta sección se estudió la aplicabilidad del nuevo biocatalizador preparado en el laboratorio, CalB-MCI; éste comparado con el biocatalizador comercial Novozym435, ya que ha

sido estudiado y utilizado para la producción de biodiesel (Zheng Y.Y. y col. 2009, Talukder M.M.R. y col. 2009).

7.2.2 Diseño experimental.

Los resultados del cálculo de la velocidad inicial a partir de los experimentos organizados en la matriz de diseño (Tabla 10) muestran: un máximo de la velocidad inicial en el experimento 12 para ambos biocatalizadores (cuyas condiciones fueron, 6:1 la razón molar de metanol: aceite de soja, 25% de biocatalizador, referido a la masa de aceite, y 5% de agua añadida), y un mínimo en el experimento 5, para Novo435, y el experimento 6, para CalB-MCI; estos dos últimos se diferencian en la concentración de agua, 2.02% para Novo435 y 7.97% para CalB-MCI.

Los datos del análisis de varianza mostraron valores significativos de los parámetros del test de Fisher; los coeficientes de determinación y correlación sugieren un buen ajuste del modelo polinomial de segundo orden propuesto para ambos biocatalizadores (ecuaciones [3] y [4]). En la Tabla 11 se agruparon los valores de los efectos lineales, cuadráticos y cruzados de las variables. Los efectos indican la influencia de la variable dependiente en la respuesta (Y, la velocidad inicial de la transesterificación). Para ambos biocatalizadores, la cantidad de biocatalizador produjo el efecto más significativo, lo que se refleja en mayores valores de la respuesta a mayor concentración de biocatalizador. Respecto a resto de variables, la razón molar, y la cantidad de agua; el modelo predice, para Novo435, que los efectos lineales influyen positivamente en el proceso, mientras que para CalB-MCI tienen un efecto negativo.

7.2.3 Comparación del curso de la transesterificación bajo condiciones óptimas.

El curso de la transesterificación en las condiciones óptimas se muestra en la Figura 8, en el que se observa una tendencia similar para ambos biocatalizadores, alcanzando después de las 72h de reacción, conversiones del 93% para Novo435 y del 99% para CalB-MCI. Los dos biocatalizadores de la enzima CalB presentan el mismo tipo de inmovilización pero diferentes soportes, esto puede ser suficiente para que los cambios promovidos en la enzima al ser inmovilizada, hayan podido favorecer diferentes interacciones entre el substrato y la enzima, disminuyendo los impedimentos difusionales y así, en el caso de CalB-MCI, promoviendo un aumento de la velocidad de reacción.

7.2.4 Reutilización de los biocatalizadores.

Una de las condiciones esenciales de los biocatalizadores para su posible uso a nivel industrial es su estabilidad operacional, lo que se mejora mediante la inmovilización pero aún así pueden aparecer problemas en los que se manifieste una pérdida de la actividad, causada por la desorción de la enzima, la inhibición de la enzima por acumulación de sustratos o productos, o simplemente su desactivación (Friedrich J.L.R. y col. 2013).

En la Figura 9 se puede observar una mayor estabilidad de las muestras de ambos biocatalizadores al utilizar n-hexano como agente de lavado entre ciclos de reacción. El efecto de los lavados con n-hexano permite evitar la acumulación de aceite o biodiesel en el microambiente de la enzima, ya que estas sustancias provocan una inactivación o inhibición del biocatalizador. Utilizando n-hexano, ambos biocatalizadores llegan a conservar alrededor de un 70% de la actividad inicial después de 8 ciclos de operación, mientras que sin tratamiento conservan sólo un 20%. Ambos biocatalizadores mostraron por tanto, una estabilidad operacional muy similar.

Los resultados del estudio de la transesterificación del aceite de soja utilizando, dos biocatalizadores de la lipasa CalB, han permitido optimizar el proceso, estableciendo mediante diseño experimental, la evaluación de las variables de mayor importancia en el proceso, y la interacción entre ellas. Se ha podido comprobar que el nuevo biocatalizador preparado por inmovilización de la lipasa CalB en un soporte altamente hidrofóbico, es tan adecuado para este proceso como el biocatalizador comercial Novo435; bajo las condiciones óptimas de reacción, el nuevo biocatalizador CalB-MCI mejora levemente los resultados, con una conversión del 99% en 72h de reacción y una productividad de 57mmol/lh, frente a los valores del 93% de conversión y productividad de 51.5mmol/lh de Novo435. En cuanto a la estabilidad operacional, ambos biocatalizadores necesitan ser lavados con n-hexano para mantener su actividad, manteniendo un 70% de la actividad hasta en ocho ciclos bajo las condiciones óptimas.

7.3 Síntesis de ésteres aromáticos.

7.3.1 Comparación de los biocatalizadores comerciales en reacciones de esterificación.

7.3.1.1 Elección del sustrato.

Para los sustratos estudiados, y los tres biocatalizadores comerciales, cuyo rendimiento de esterificación se muestra en la Figura 10, se obtienen las mejores conversiones para el

biocatalizador Novo435, mientras TL-IM fue el biocatalizador menos activo de los tres. En cuanto al ácido, se obtienen mejores resultados utilizando el ácido butírico, para los tres biocatalizadores. El único alcohol secundario estudiado, el 2-propanol se mostró como el peor sustrato en esterificación, independientemente del ácido utilizado; sólo se da una excepción, en el caso de la combinación de 2-propanol y ácido acético, utilizando el biocatalizador TL-IM con el que se consiguen las mayores conversiones de esterificación con este biocatalizador. Para RM-IM se obtuvieron los mejores resultados para el ácido acético combinado con etanol y 1-butanol. En general, cuanto mayor sea la cadena del ácido, mayor la conversión de la esterificación.

7.3.1.2 Diseño experimental.

Las siguientes combinaciones de sustratos se eligieron por el posible interés del éster obtenido como producto de la industria alimentaria; y según lo mostrado en la Figura 10, por existir a una mayor posibilidad de la optimización del proceso (lo que se buscó con el diseño experimental siguiente). Para Novo435 se eligieron como sustratos el ácido acético y 1-pentanol; para RM-IM, ácido butírico y 1-pentanol; y para TL-IM, ácido butírico y etanol

La variable respuesta estudiada fue el rendimiento de la esterificación (en 2h de reacción para Novo435 y RM-IM, y 5h de reacción para TL-IM); en la Tabla 13 se muestran los resultados de la esterificación para cada biocatalizador. En los experimentos diseñados se obtuvieron valores de la conversión que variaron desde un 10 a un 80%, de ahí la importancia de la optimización de las variables del proceso.

Los resultados del análisis de varianza y los coeficientes de ajuste indican que el modelo predice de manera adecuada los resultados experimentales.

Los efectos de las variables recogidos en la Tabla 14, indican una mayor importancia para el efecto de la variable x_2 , es decir, la cantidad de biocatalizador, en la conversión de las reacciones de esterificación de los tres biocatalizadores comerciales. Este resultado es esperado ya que el aumento de la cantidad de enzima está relacionado directamente con la velocidad de reacción.

7.3.1.3 Comparación de los cursos de esterificación bajo condiciones óptimas.

Para las condiciones óptimas (Tabla 15), se compararon los cursos de esterificación en la Figura 11, donde se observan para los tres biocatalizadores, valores de la conversión alcanzados de más del 90%, lo que valida experimentalmente el modelo de ajuste.

7.3.1.4 Reutilización de los biocatalizadores.

Para comprobar la estabilidad operacional de los tres biocatalizadores comerciales se representó en la Figura 12, el curso de la inactivación en sucesivos ciclos (entre los cuales los biocatalizadores fueron lavados con n-hexano). De los resultados mostrados en la Figura 12, destaca la estabilidad del biocatalizador Novo435 frente a los biocatalizadores de las enzimas TLL y RML; Novo435 conserva un 80% de su actividad después de 10 ciclos de reacción, mientras RM-IM conserva un 35% a los 3 ciclos, y TL-IM menos de un 30% a los 4 ciclos.

Reuniendo los resultados aquí mostrados para la comparación de los tres biocatalizadores comerciales, se puede concluir que los tres biocatalizadores alcanzaron, bajo las condiciones óptimas y los sustratos seleccionados, una elevada actividad, alcanzando sobre un 90% de conversión en menos de 6h. Se observó la alta dependencia de la combinación de sustratos en la actividad de esterificación. El biocatalizador que presenta mejores propiedades para su utilización en reacciones de esterificación es Novo435, alcanza valores de conversión superiores en menor tiempo y su actividad operacional es mayor a los otros dos biocatalizadores comerciales.

7.3.2 Comparación del nuevo biocatalizador CalB-MCI y el comercial, Novozym 435 en reacciones de esterificación.

Con el fin de estudiar la aplicabilidad en reacciones de esterificación del nuevo biocatalizador preparado en el laboratorio, CalB-MCI, se analizaron las reacciones de síntesis de butirato de etilo y acetato de butilo. Los resultados del análisis fueron comparados con el biocatalizador comercial de CalB, Novo435.

Gracias a la electroforesis, mostrada en la Figura 13, se pudo comprobar que la carga del biocatalizador comercial era mayor al biocatalizador preparado CalB-MCI ($115\text{mg}_{\text{CalB}}/\text{g}$), ya que se observó que la banda del sobrenadante de Novo435 era más intensa que la de CalB-MCI.

7.3.2.1 Síntesis del acetato de butilo.

De los estudios previos a la optimización de las condiciones de reacción, se realizó un análisis del efecto de la concentración del ácido sobre la actividad de la enzima. La presencia en el medio de reacción de ácido, puede provocar un efecto nocivo en la enzima, por causar un descenso del pH. Los resultados se representaron en la Figura 14, donde se observa un curso lineal de la velocidad inicial de reacción con la concentración; para Novo 435, es lineal hasta una

concentración de 0.4M de ácido acético para luego caer a concentraciones mayores (no representados los valores en la Figura 14); en el caso de CalB-MCI, la tendencia es lineal hasta una concentración de ácido de 0.3M para luego, a mayores valores de concentración, mantenerse el valor de la velocidad inicial. Este comportamiento indica que una excesiva concentración de ácido en el medio provoca efectos nocivos sobre la actividad de la enzima y su estabilidad. Entre los dos biocatalizadores CalB-MCI es más estable en ambientes con mayor concentración de ácido.

7.3.2.1.1 Efecto de la razón molar de sustrato en la actividad de esterificación.

La razón molar de sustrato se refiere al exceso de alcohol sobre el valor estequiométrico, lo que afecta al equilibrio de la reacción. En la Figura 15 se representó la velocidad de reacción inicial frente a la razón molar, en ésta se observan valores máximos de las velocidades iniciales para una razón molar de 1:3, en Novo435, y 1:5 en el biocatalizador CalB-MCI. Los valores de la velocidad inicial fueron siempre superiores para Novo435, en todas las concentraciones del alcohol, n-butanol. Una posible explicación de los resultados puede ser la diferente hidrofobicidad de los soportes en los biocatalizadores, siendo, para materiales más hidrofóbicos, como MCI, menos accesible el alcohol al ambiente de la enzima.

7.3.2.1.2 Efecto de la cantidad de biocatalizador en la velocidad inicial de reacción.

En la Figura 16 se representó la velocidad inicial de reacción frente al porcentaje de biocatalizador utilizado (respecto a la suma de las masas de los sustratos); el efecto del aumento de la cantidad de biocatalizador en la síntesis del acetato de butilo, es similar en ambos biocatalizadores; hasta valores del 10% de biocatalizador la tendencia es lineal para luego decrecer. Los valores de la velocidad inicial fueron para el biocatalizador comercial, siempre superiores a CalB-MCI. En principio, el aumento de la cantidad de biocatalizador es en general positivo, pero para ciertos niveles puede producir cambios en los parámetros de la reacción como un desequilibrio de la cantidad disponible de agua o de sustratos.

7.3.2.1.3 Efecto de la cantidad de agua añadida en la actividad de esterificación.

En la Figura 17 se observan dos valores máximos de la velocidad inicial para una concentración de agua añadida, 0,8% para Novo435 y 0.4% para CalB-MCI. Este hecho puede ser explicado teniendo en cuenta que el soporte utilizado para inmovilizar Novo435 (Iewatit) es un material capaz de adsorber agua, por lo que la cantidad de agua disponible para la enzima siempre

es menor a la añadida; esto no ocurriría en el caso de CalB-MCI, ya que el soporte basado en la resina de poli-estireno-divinilbenceno es muy hidrofóbico y no adsorbe agua fácilmente.

7.3.2.1.4 Efecto de la temperatura en la actividad de esterificación.

En la Figura 18 se representó el efecto de la temperatura sobre la velocidad inicial, donde se observan los máximos a 35°C para Novo435, y 40°C para CalB-MCI. Los efectos de la temperatura sobre la reacción son en principio favorables para el aumento de la actividad, pero existen otros fenómenos que pueden favorecer diferentes resultados, como son la distorsión de la conformación de la enzima, ya que la temperatura puede afectar a la intensidad de la adsorción de la enzima en el soporte, y la adsorción del sustrato y el agua en la matriz del biocatalizador.

7.3.2.1.5 Esterificación en condiciones óptimas.

Finalmente, se obtuvieron las condiciones óptimas para cada biocatalizador en la síntesis del acetato de butilo; en la Figura 19, se representó la cinética de la esterificación bajo las condiciones óptimas. Para cada biocatalizador la curva fue diferente, aunque la conversión final (a las 2h) fue la misma en los dos biocatalizadores de CalB, un 91%. En el caso de Novo435 la velocidad inicial de la reacción es mayor pero la cinética se curva antes de la hora del inicio de la reacción. Para CalB-MCI la cinética es prácticamente lineal en el tiempo de esterificación estudiado. La pronunciación de la curvatura en la cinética de la esterificación para Novo435 puede estar debida a existir una acumulación de los productos en el medio que comprende el ambiente de la enzima, en este caso agua. El efecto de esta acumulación puede promover la inactivación de la enzima, o su inhibición. Al tratarse de una matriz muy hidrofóbica en el caso del biocatalizador CalB-MCI, el agua no llegaría a acumularse en el ambiente de la enzima inmovilizada.

7.3.2.1.6 Reutilización de los biocatalizadores.

En la Figura 20 se evaluó la estabilidad operacional de los biocatalizadores de CalB, observando una clara ventaja del uso del nuevo biocatalizador CalB-MCI frente al comercial Novo435; la estabilidad del biocatalizador preparado en el laboratorio supuso la retención del 70% de la actividad después de seis ciclos de reacción, mientras que para Novo435, tras 2 ciclos de reacción no pudo detectarse actividad. Las muestras de ambos biocatalizadores utilizadas en estos experimentos no fueron tratadas entre ciclos con n-hexano, como se hizo en los apartados anteriores, de esta manera se busca simplificar las etapas de operación y disminuir costes.

7.3.2.2 Síntesis del butirato de etilo.

El estudio de la síntesis de butirato de etilo comenzó con la obtención de un valor óptimo de la concentración de ácido butírico; el comportamiento de la velocidad de esterificación en función de la concentración de ácido se representó en la Figura 21, donde se aprecia una tendencia idéntica para ambos biocatalizadores de CalB, el aumento de la concentración de ácido está acompañado de un aumento de la velocidad de manera lineal hasta valores de la concentración de 0.7M, para luego decrecer a concentraciones mayores. Para el ácido butírico es posible trabajar a concentraciones mayores que para el ácido acético (como se pudo ver en la Figura 14), consiguiendo con la combinación del ácido butírico y el etanol, mayores actividades que para el ácido acético y el butanol. En el caso del ácido acético las diferencias entre los dos biocatalizadores es apreciable, mientras que en este caso, ambos muestran el mismo efecto frente a la concentración de ácido.

7.3.2.2.1 Diseño experimental.

La optimización de la conversión de la esterificación se estudió para un tiempo de reacción de 1h, lo que, por el corto tiempo de reacción, es interesante para las posibles aplicaciones a nivel industrial. De los resultados de la experimentación organizados en la matriz de diseño (Tabla 17) se obtuvieron numerosos valores de la conversión mayores al 60%, siendo las menores conversiones del 40%.

Los valores de los parámetros del análisis de varianza y los coeficientes de ajuste de los polinomios resultaron en un modelo de ajuste adecuado para predecir los datos experimentales.

Del análisis de los efectos se observó que el más importante de los efectos fue la cantidad de biocatalizador (x_3), para ambos biocatalizadores. Fueron también importantes, los efectos de la razón molar de sustrato (X_2) y la cantidad de agua (X_4), para Novo435, y la temperatura (X_1) para CalB-MCI, lo que indica la diferencia entre los dos biocatalizadores.

7.3.2.2.2 Esterificación en condiciones óptimas.

Los valores óptimos para la conversión propuestos por el modelo (Tabla 18) se utilizaron para representar el curso de la síntesis de butirato de etilo (Figura 22), donde se observa las dos diferentes cinéticas de esterificación de los biocatalizadores; aunque la conversión alcanzada es la misma para ambos biocatalizadores, sobre un 86%, la velocidad inicial del nuevo biocatalizador,

CalB-MCI, es superior, siendo la productividad de éste 595mmol/lh frente a 396mmol/lh para Novo435. Si se considera que, como se pudo comprobar en la electroforesis de ambos biocatalizadores (Figura 13) Novo435 tiene el doble de carga que el nuevo biocatalizador preparado en el laboratorio, el resultado sería una mejora de la eficiencia catalítica en esta reacción de un factor de 3 comparada con Novo435.

7.3.2.2.3 Reutilización de los biocatalizadores.

En la Figura 23 se representaron las muestras de ambos biocatalizadores sometidos a sucesivos ciclos de reacción, con y sin tratamiento con n-hexano. Como en experiencias anteriores, el tratamiento con n-hexano permite recuperar mayor actividad durante más ciclos de esterificación, para ambos biocatalizadores. Las muestras con tratamiento conservaron un 80% de la actividad, en el caso de CalB-MCI, y un 20% para Novo435, después de 8 ciclos de reacción.

Para concluir, los resultados del estudio de la esterificación de acetato de butilo y butirato de etilo catalizados por los dos biocatalizadores de la enzima CalB, CalB-MCI y Novo435, han resultado mostrar diferencias significativas. Las condiciones óptimas obtenidas del diseño experimental y los resultados de operación, fueron muy diferentes para la síntesis de acetato de butilo y para el butirato de etilo, lo que muestra una diferente especificidad de los biocatalizadores frente a la combinación de sustratos. En la síntesis del acetato de butilo, Novo435 presenta una actividad inicial en las condiciones óptimas, un 30% superior a la actividad de CalB-MCI, sin embargo, la cinética de este nuevo biocatalizador presenta una tendencia lineal que compensa la baja actividad inicial, para alcanzar finalmente, una conversión similar a la alcanzada por el biocatalizador comercial. En el caso de la síntesis del butirato de etilo, CalB-MCI, supera en velocidad inicial a Novo435, alcanzando nuevamente una conversión final similar. Se ha podido comprobar que el nuevo biocatalizador soporta concentraciones de ácido superiores a Novo435, siendo más importante la diferencia en ácidos de cadena corta como el ácido acético. CalB-MCI presenta una estabilidad operacional muy superior a la de Novo435, y, en el caso de la síntesis del acetato de butilo, se comprobó que no es necesario lavar el biocatalizador con n-hexano.

7.3.3 Comparación del nuevo biocatalizador TLL-MCI y el comercial, TL-IM en reacciones de esterificación.

En la figura de la electroforesis (Figura 24) se observó una mayor cantidad de enzima presente en el biocatalizador preparado en el laboratorio, TLL-MCI, pero una menor actividad por gramo de biocatalizador del derivado comercial, lo que sugiere que el nuevo biocatalizador de TLL muestra mayor actividad en esterificación al ser inmovilizado en el soporte MCI (Martins A.B. y col. 2013b).

Los resultados de la evaluación de la presencia de ácido butírico se mostraron en la Figura 25. Estos revelaron valores de la velocidad inicial muy similares en ambos biocatalizadores hasta concentraciones de ácido de 0.5M, para luego descender la actividad a mayores concentraciones de ácido. La resistencia del biocatalizador TLL-MCI es mayor a la presencia de ácido ya que su tendencia lineal creciente se extiende a concentraciones mayores (hasta 0.7M). Para comprobar si la pérdida de actividad observada era debida a una distorsión de la estructura de la enzima, al descenso del pH del medio de reacción, a la inhibición por concentración de sustrato, o a la inactivación de la enzima, se realizaron una serie de experimentos, para ambos biocatalizadores. En ellos se midió la concentración de producto con el tiempo a dos concentraciones de ácido diferentes, 0.5M y 1M, y se compararon las curvas (Figura 25b). Los resultados muestran que un aumento de la concentración del sustrato ácido produce una disminución de la actividad de ambos biocatalizadores, pero, los cursos de reacción se mantienen lineales a ambas concentraciones, lo que sugiere en una posible inhibición de la enzima por presencia de alta concentración de sustrato, y no una inactivación.

7.3.3.1 Efecto de la razón molar de sustrato sobre la actividad de esterificación.

En la Figura 26 se observó un incremento de la velocidad inicial para el biocatalizador TL-IM hasta el valor 2:1 para luego decrecer, mientras el biocatalizador TLL-MCI presenta los mayores valores de la velocidad inicial para la relación estequiométrica. Esto puede estar debido a que en el caso de TLL-MCI la forma abierta de la enzima está estabilizada por adsorción en el soporte hidrofóbico MCI, y de esta manera el sustrato sería más accesible a la enzima, mientras que en el caso de TL-IM el mecanismo de inmovilización no implica la estabilización por adsorción de la forma abierta de la enzima, sino está basado en un mecanismo de intercambio iónico (Fernández-Lafuente R. 2010).

7.3.3.2 Efecto de la cantidad de agua añadida en la actividad de esterificación.

En la Figura 27 se estudió la influencia de la concentración de agua sobre la velocidad inicial de la reacción; se pudo comprobar que la influencia de la cantidad de agua sobre el biocatalizador TLL-MCI es muy baja en el rango analizado. Para TL-IM, se observa un leve aumento de la velocidad inicial hasta valores del 0.25%, para luego mantenerse, y descender a partir del 0.75% de agua añadida.

7.3.3.3 Efecto de la temperatura en la actividad de esterificación.

En la Figura 28, se puede observar que el biocatalizador TLL-MCI presenta una actividad mayor en un rango más amplio de temperatura que TL-IM.

7.3.3.4 Efecto de la cantidad de biocatalizador en la velocidad inicial de reacción.

La cantidad de biocatalizador utilizada, se estudió en diferentes intervalos, teniendo en cuenta la carga de los biocatalizadores y su actividad específica, ya que TLL-MCI mostró una actividad específica el doble que TL-IM en reacciones de esterificación. En la Figura 29 es destacable el comportamiento observado a una concentración del 10% de biocatalizador, donde se alcanza el máximo de la velocidad inicial para TL-MCI, y una actividad no detectable para el caso de el biocatalizador comercial TL-IM.

7.3.3.5 Esterificación en condiciones óptimas.

Finalmente se llevaron a cabo las reacciones de esterificación en las condiciones óptimas, representadas en Figura 30; en esta figura se observan valores similares de la conversión a las 8h de reacción, y de la velocidad inicial, sin embargo, se necesitaron 3 veces más cantidad de enzima para TL-IM que para TLL-MCI, por lo que el balance del proceso hace más eficiente la actuación del nuevo biocatalizador.

En vista de los resultados, la utilización del nuevo biocatalizador TLL-MCI presenta mejoras en la síntesis del butirato de butilo, respecto al biocatalizador comercial TL-IM: la inmovilización en el soporte hidrofóbico MCI permite una mayor capacidad de carga, una mayor estabilidad en concentraciones mayores de ácido, y una productividad 4.5 veces mayor que el biocatalizador comercial.

7.4 Esterificación mediante agitación por ultrasonidos.

La aplicación de agitación mediante ultrasonidos introduce en el proceso una manera de homogeneizar la mezcla de reacción, mejorando la mezcla entre las fases, y así, la transferencia de materia, además de evitar la generación de posibles microambientes alrededor de la enzima, de reactivos o productos, que pueden promover su inactivación y por tanto la pérdida de la estabilidad operacional del biocatalizador (Martins A.B. y col. 2013b, Alves J.S. y col. 2014).

7.4.1 Diseño experimental.

Del análisis de varianza y los coeficientes de ajuste se obtuvo un modelo adecuado para representar los datos experimentales de la síntesis del acetato de butilo catalizada por CalB-MCI, bajo la agitación mediante ultrasonidos.

Los efectos más importantes fueron la cantidad de biocatalizador, y la temperatura. El valor del efecto de la cantidad de agua fue mucho menor que los anteriores y con influencia negativa sobre la velocidad inicial de reacción.

7.4.2 Esterificación en condiciones óptimas.

Los cursos de la esterificación para el biocatalizador CalB-MCI en las dos condiciones óptimas, propuestas tras el diseño experimental, se han representado en la Figura 31, donde se observan ambas curvas prácticamente solapadas en ambas condiciones, caracterizadas por diferentes valores de todas las variables estudiadas.

7.4.3 Reutilización del biocatalizador.

En la Figura 33 se evaluó la estabilidad operacional en las dos condiciones óptimas sin tratamiento de las muestras con n-hexano. Cuando el curso de la reacción no presentó diferencias para las dos condiciones óptimas, en el caso de la estabilidad se puede observar una clara ventaja de la utilización de la condición donde se trabaja a menor temperatura, pero también con menos cantidad de biocatalizador. Se consigue conservar en estas condiciones, un 70% de la actividad tras 7 ciclos de esterificación, sin ser necesario lavar las muestras con n-hexano.

7.4.4 Efecto de la concentración de ácido sobre la actividad de esterificación.

Finalmente se evaluó el efecto de la concentración de ácido en la actividad del biocatalizador para comprobar la ventaja del uso de ultrasonidos frente a la agitación mecánica. En la Figura 33 se observa una conversión del 96% antes de las 2h de reacción, para concentraciones de 0.3M de ácido, y un 88% para las 2.5h a concentraciones de 2M de ácido. Ambas condiciones son buenas y mejoran los resultados obtenidos en la esterificación del acetato de butilo mediante agitación mecánica.

Sin embargo, las ventajas que presenta este tipo de agitación son más visibles para el biocatalizador comercial Novo435 (Martins A.B. y col. 2013b), en el que se ve claramente mejorada la productividad y la estabilidad operacional.

En la Tabla 22 se resumieron las condiciones y resultados de la aplicación de la tecnología de los ultrasonidos en la síntesis de acetato de butilo catalizada por los biocatalizadores de CalB, CalB-MCI, y el comercial Novo435. En esta tabla se percibe una mejora de la conversión, para CalB-MCI, alcanzada en menor tiempo, y con menor cantidad de sustratos; se obtiene, utilizando mayor cantidad de ácido una productividad para CalB-MCI en ultrasonidos, de 840mmol/lh frente a 220mmol/lh en agitación mecánica.

La mejora de los resultados de la esterificación están basados principalmente en la mejor mezcla que proporciona la tecnología de los ultrasonidos, a la vez que evita la acumulación en el microambiente de la enzima, de productos nocivos como el agua. Este efecto resultó ser más evidente en el biocatalizador comercial porque para CalB-MCI la alta hidrofobicidad del soporte, ya proporcionaba este efecto sobre la enzima, protegiéndola de los productos de reacción mediante el ambiente hidrofóbico del soporte.

8 CONCLUSIONES

De los estudios y ensayos recogidos en esta tesis se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. El soporte commercial MCI, basado en una resina de poli estireno-divinilbenceno, es un material adecuado para la inmovilización de las enzimas estudiadas. Su precio es competitivo, la inmovilización es rápida y sencilla, y se consiguen elevadas capacidades de carga. El efecto de la inmovilización en la actividad enzimática promueve un aumento de la actividad frente a algunos sustratos. En cuanto a la estabilidad, los nuevos biocatalizadores preparados , mejoran su resistencia frente a disolventes; sin embargo, el alto carácter hidrofóbico del soporte MCI, juega un papel decisivo en la termoestabilidad, siendo inferior la capacidad de resistencia de los biocatalizadores preparados en MCI, si se comparan con otros inmovilizados en soportes menos hidrofóbicos.
2. En la producción de biodiesel, se optimizaron las condiciones de operación de los dos biocatalizadores de la lipasa CalB. La comparación del biocatalizador comercial Novo435 y el nuevo biocatalizador en MCI mostró resultados similares en cuanto a actividad y estabilidad. El nuevo biocatalizador mejora levemente la conversión y la actividad inicial; lo que lo hace conveniente para su posible aplicación en la producción de biodiesel.
3. En el estudio de la síntesis de diferentes ésteres aromáticos se identificaron las variables más influyentes del proceso; siendo, especialmente importantes para la estabilidad operacional de los biocatalizadores, la acumulación de agua y de ácidos carboxílicos en el medio. Gracias a su carácter altamente hidrofóbico, los nuevos biocatalizadores preparados en MCI, consiguen aportar a la enzima inmovilizada un microambiente separado de moléculas hidrofílicas como el agua o los ácidos carboxílicos; de esta manera, se consigue solucionar parcialmente este problema, aportando mayor estabilidad operacional a los biocatalizadores preparados en el soporte MCI.
4. La producción de ésteres aromáticos se optimizó para diferentes combinaciones de ácidos y alcoholes, utilizando biocatalizadores comerciales de tres de las enzimas estudiadas. Los resultados mostraron que el mejor biocatalizador es Novo435, en cuanto a la producción de éster y estabilidad del biocatalizador.
5. Igualmente, se comparó el comportamiento en la síntesis de diferentes ésteres aromáticos para los nuevos biocatalizadores, y los comerciales. Se observa que, aún siendo el mismo, el tipo de inmovilización, la variación de las propiedades de los soportes, influye en gran medida en los

resultados del proceso. Los nuevos biocatalizadores pueden ser utilizados en concentraciones mayores de ácido. Se obtienen actividades específicas mayores, las cinéticas de síntesis del éster son más lineales, alcanzando valores de productividad superiores a los biocatalizadores comerciales. La estabilidad operacional también se ve mejorada para los nuevos biocatalizadores preparados en MCl, no siendo esencial la etapa de lavado con n-hexano entre ciclos de esterificación

El uso de la tecnología de ultrasonidos para obtener mezclas de reacción más homogéneas, mejora la actividad inicial en la síntesis de ésteres, y lo que es más destacable, la estabilidad operacional de los biocatalizadores. El alcance de la mejora es mayor en los biocatalizadores inmovilizados en soportes más hidrofílicos, entre los estudiados, los biocatalizadores comerciales.

9 BIBLIOGRAFÍA

Alves J.S., Garcia-Galan C., Schein F.M., Silva M.A., Barbosa O., Ayub Z.M.A., Fernández-Lafuente R., Rodrigues R.C. (2014). Combined Effects of Ultrasound and Immobilization Protocol on Butyl Acetate Synthesis Catalyzed by CalB. *Molecules*. 19(7):9562-9576.

Bajaj A., Lohan P., Jha N.P., Mehrotra R. (2010). Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62: 9-14.

Bickerstaff G.F. (1997). *Methods in biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. Hemana Press.

Bommarius A.S., Riebel B.R. (2004). *Biocatalysis*. Wiley-Vch.

Bommarius A.S., Blum J.K., Abrahamson M.J. (2011). Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. *Opinion in Chemical Biology*. 15:194-200.

Bradford, M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.

Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Huge-Jensen B., Patkar S.A. Thim L. (1991). A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase inhibitor complex. *Nature*. 351:491-494.

Cabrera Z., Fernández-Lorente G., Fernández-Lafuente R., Palomo J.M., Guisán J.M. (2009), Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 57 (1-4):171-176.

Cowan D.A., Fernández-Lafuente R. (2011). Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*. 49:326-346.

Deshmane G.V., Gogate R.P., Pandit B.A. (2009). Ultrasound assisted synthesis of isopropyl esters from palm fatty acid distillate. *Ultrasonics Sonochemistry*. 16:345-350.

Dhake K.P., Thakare D.D., Bhanage B.M. (2012). Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour and Fragrance Journal*. 28:71-83.

Dordick J.S. (1991). *Topics in Applied Chemistry. Biocatalysis for Industry*. Plenum Press.

EN 14103. (2001). Fat and oil derivatives - fatty acid methyl esters (FAME). Determination of esters and linolenic acid methyl esters content, European Committee for Standardization.

Fernández-Lafuente R., Armisen P., Sabuquillo P., Fernández-Lorente G., Guisán J.M. (1998). Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and Physics of lipids*. 93:185-197.

Fernández-Lafuente R. (2010). Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 62 (3-4):197-212.

Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Cabrera Z., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. (2007a). Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports, *Enzyme and Microbial Technology*. 41:565-569.

Fernández-Lorente G., Palomo J.M., Guisán J.M., Fernández-Lafuente R. (2007b). Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase® Ultra. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 47: 99-104.

Fernández-Lorente G., Cabrera Z., Godoy C., Fernández-Lafuente R., Palomo J.M., Guisán J.M. (2008). Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: effect of the support nature on the biocatalytic properties. *Process Biochemistry*. 43: 1061-1067.

Friedrich J.L.R., Peña P.F., Garcia-Galan C., Fernández-Lafuente R., Ayubb A.Z.M., Rodrigues R.C. (2013). Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 88(6):1089-1095.

Gandhi N.N. (1997). Applications of lipase. *Journal of the America Oil Chemist's Society*. 74 (6):621-634.

Graebin G.N., Martins B.A, Lorenzoni A.S.G., Garcia-Galan C., Fernández-Lafuente R., Ayub Z.M.A., Rodrigues R.C. (2012). Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica* on Porous

Styrene-Divinylbenzene beads Improves Butyl Acetate Synthesis. *Biotechnology Progress*. 28(2): 406-412.

Hanh D.H., Dong T.N., Starvarache C., Okitsu K., Maeda Y., Nishimura R. (2008). Methanolysis of triolein by low frequency ultrasonic irradiation. *Energy Conversion and Management*. 49:276-280.

Hasan F., Ali Shah A., Hameed A. (2006). Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*. 39:235-251.

Hernández K., Fernández-Lafuente R. (2011a). Lipase B from *Candida antarctica* immobilized on octadecyl Sepabeads: A very stable biocatalyst in the presence of hydrogen peroxide. *Process Biochemistry*. 46: 873-878.

Hernández K., García-Verdugo E., Poncar R., Fernández-Lafuente R. (2011b). Hydrolysis of triacetin catalysed by immobilized lipases: effect of the immobilization protocol and experimental conditions on diacetin yield. *Enzyme and Microbial Technology*. 48:510-517.

Hernández K., García-Galán C., Fernández-Lafuente R. (2011c). Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinilbenzene beads. *Enzyme and Microbial Technology*. 49:72-78.

Hernández K., Fernández-Lafuente R. (2011d). Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology*. 48:107-122.

Huang Y., Zheng H., Yan Y. (2010). Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 160(2):504-15.

Illanes A. (2008). *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*. Springer. (ISBN 978-1-4020-8360-0).

Kwiatkowska B., Bennett J., Akunna J., Walker M.G., Bremner H.D. (2011). Stimulation of bioprocesses by ultrasound. *Biotechnology Advances*. 29: 768-780.

Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.

Liese A., Seelbach K., Wandrey C. (2006). Industrial Biotransformations, segunda edición. Wiley-VCH.

Lorenzoni A.S.G., Graebin N.G., Martins A.B., Fernández-Lafuente R., Záchia Z.M.A., Rodrigues R.C. (2012). Optimization of pineapple flavour synthesis by esterification catalysed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. Flavour and Fragrance Journal. 27(2): 196-200.

Loughlin W.A. (2000). Biotransformations in organic synthesis. Bioresource Technology. 74:49-62.

Madeira Lau R., Van Rantwijk F., Seddon K.R., Sheldon R.A. (2000). Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. Organic Letters 2(26):4189-91.

Martins A.B., Graebin N.G., Lorenzoni A.S.G., Fernández-Lafuente R., Ayub M.A.Z., Rodrigues R.C. (2011). Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. Process Biochemistry. 46(12): 2311-2316.

Martins A.B., Friedrich J. L. R., Rodrigues R. C., Garcia-Galan C., Fernández-Lafuente R., Ayub M.A.Z. (2013a). Optimized Butyl Butyrate Synthesis Catalyzed by *Thermomyces lanuginosus*. Biotechnology Progress. 29(6): 1416-1421.

Martins A.B., Schein M. F., Friedrich J. L. R., Fernández-Lafuente R., Ayub M.A.Z., Rodrigues R.C. (2013b). Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed by Novozym435: enhanced activity and operational stability. Ultrasonics Sonochemistry. 20:1155-1160.

Martins A.B., da Silva M. A., Scheina F. M., Garcia-Galan C., Ayub Z. M. A., Fernández-Lafuente R., Rodrigues C. R. (2014). Comparison of the performance of commercial immobilized lipase synthesis of different flavor esters. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 105:18-25.

Mateo C., Palomo J. M., Fernández-Lorente G., Guisán J. M., FernándezLafuente R. (2007). Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. Enzyme Microbial Technology. 40:1451-1463.

Palomo J.M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Ortiz C., Fernández-Lafuente R., Guisan J. M. (2002a). Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters. Enzyme and Microbial Technology. 31:775-783.

Palomo J.M., Muoz G., Fernández-Lorente G., Mateo C., Fernández-Lafuente R., Guisán J. M. (2002b). Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme*. 19-20: 279-86.

Palomo J.M. (2009). Modulation of enzymes selectivity via immobilization. *Current Organic Synthesis*, 6, 1–14.

Polaina J., MacCabe P. A. (2007). *Industrial Enzymes Structure, Function and Applications*. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC. Valencia. Editorial Springer. ISBN 978-1-4020-5377-1.

Poppe J.K., Garcia-Galan C., Matte R.C., Fernández-Lafuente R., Rodrigues R.C., Ayub Z. M. A. (2013). Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 94: 51-56.

Rodrigues R.C., Volpato G., Wada K., Ayub M.A.Z. (2008). Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 85: 925-930.

Rodrigues R.C., Fernández-Lafuente R. (2010a). Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 64(1-2):1-22.

Rodrigues R.C., Fernández-Lafuente R. (2010b). Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 66(1-2):15-32.

Rodrigues R.C., Ayub Z.M.A. (2011). Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. *Process Biochemistry*. 46:682-688.

Rodrigues R.C., Ortiz C., Berenguer-Murcia A., Torres R., Fernández-Lafuente R. (2013). Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*. 42:6290-6307.

Rodrigues R.C., García-Galán C., Barbosa O., Hernández K., dos Santos J.C.S., Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R. (2014). Immobilization of proteins in poly-styrene-

divinylbenzene beads: functional properties and applications. *Current Organic Chemistry*. Revisión invitada. Artículo enviado.

Rokhina V.E., Lens P., Virkutyte J. (2001). Low-frequency ultrasound in biotechnology: state of the art. *Trends in Biotechnology*. 27(5):298-306.

Sandwick R.K., Schray K.J. (1987). The activation of enzymes upon interaction with a hydrophobic latex surface. *Journal of Colloid Interface Science*. 115:130-138.

Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts G.M. (2003). Dispelling the Myths of Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science* 299, 1694-1697.

Sheldon R.A. (2007). Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. *Advanced Synthesis in Catalysis*. 349:1289-1307.

Straathof A.J.J., Panke S., Schmid A. (2002). The production of fine chemicals by biotransformations. *Current Opinion in Biotechnology*. 13:548-556.

Straathof A.J.J., Adlercreutz P. (2005). *Applied Biocatalysis*, segunda edición. Harwood Academic Publishers.

Talukder M.M.R., Wu J.C., Bich T., Nguyen V., Fen N.M., Melissa Y.L.S. (2009). Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 60(3-4):106-112.

Tufvesson P., Wenjing F., Skibsted Jensen J., Woodley J.M. (2010). Process considerations for the scale-up and implementation of biocatalysis. *Food and Bioproducts Processing*. 88:3-11.

Wohlgemuth R. (2010). Biocatalysis. Key to sustainable industrial chemistry. *Current Opinion in Biotechnology*. 21:713–724.

Worsfold P. (2005). *Encyclopedia of Analytical Science*, 2ª edición. Elsevier.

Zaks A. (2001). Industrial biocatalysis. *Current Opinion in Chemical Biology*. 5:130–136.

Zheng Y.Y., Jing Q., Xin N., Li-Min Z., Bo J., Zhi-Yan H. (2009). Lipase-catalyzed transesterification of soybean oil for biodiesel production in tert-amyl alcohol. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25(1): 41-46.

10 ANEXOS

10.1 Publicaciones

10.1.1 Artículos enviados:

Alves J.S., García-Galán C., Danelli D., Paludo N., Barbosa O., Rodrigues R.C., Fernández-Lafuente R. Use of lecithase Ultra immobilized on styrene-divinylbenzene beads as catalyst of esterification reactions: effect of ultrasounds. *Catalysis Today*.

Rodrigues R.C., García-Galán C., Barbosa O., Hernández K., dos Santos J.C.S., Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R. Immobilization of proteins in poly-styrene-divinylbenzene beads: functional properties and applications. *Current Organic Chemistry*. Revisión invitada.

10.1.2 Artículos relacionados con la tesis:

Dos Santos J.C.S., García-Galán C., Rodrigues R.C., de Sant'Ana H.B., Gonçalves L.R.B., Fernández-Lafuente R. (2014). Stabilizing hyperactivated lecithase structures through physical treatment with ionic polymers. *Process Biochemistry*. Enviado

Dos Santos J.C.S., García-Galán C., Rodrigues R.C., de Sant'Ana H.B., Gonçalves L.R.B., Fernández-Lafuente R. (2014). Improving the catalytic properties of immobilized lecithase via physical coating with ionic polymers *Enzyme Microbial Technology*. 60:1-8.

García-Galán C., Berenguer-Murcia A., Fernández-Lafuente R., Rodrigues R.C. (2011). Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis and Catalysis*. 353:2885-2904.

García-Galán C., Barbosa O., Ortiz C., Torres R., Rodrigues R.C., Fernández-Lafuente R. (2013). Biotechnological prospects of the lipase from *Mucor javanicus*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 93:34-43.

García-Galán C., Barbosa O., Fernández-Lafuente R. (2013). Stabilization of the hexameric glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* by cations and polyethyleneimine. *Enzyme and Microbial Technology*. 52:211-217.

García-Galán C., dos Santos J.C.S., Barbosa O., Torres R., Pereira E.B., Corberán V.C., Gonçalves L.R.B., Fernández-Lafuente R. (2014). Tuning of Lecithase features via solid-phase chemical modification: Effect of the immobilization protocol. *Process Biochemistry*. 49(4):604-616.

10.2 Índice de Figuras

- Figura 1. Substratos aromáticos utilizados en las reacciones de hidrólisis catalizadas por los biocatalizadores estudiados..... 25
- Figura 2. Substratos alifáticos utilizados en las reacciones de hidrólisis catalizadas por los biocatalizadores estudiados..... 26
- Figura 3. Curso de inmovilización de la enzima CalB en los soportes C18 (cuadrados), Diaion (círculos) y MCI (triángulos). La inmovilización se llevó a cabo pesando 1g de soporte al que se le añadió 40ml de una disolución 0.5mg/ml de CalB en tampón fosfato 5mM pH7. La actividad residual se refiere a la actividad medida en el sobrenadante respecto a la actividad inicial de la disolución enzimática. 34
- Figura 4. Inactivación térmica. Los biocatalizadores fueron incubados a 60°C. Se pesó 1g de cada biocatalizador, preparados con 20mg_{enzima}/g; estos fueron suspendidos en 20ml de tampón fosfato de sodio 10mM a pH7. Se extrajeron muestras periódicamente y se midió la actividad mediante el ensayo estándar de actividad con p-NPB. El porcentaje de actividad residual se refiere a la relación entre la actividad en el momento de medida y la actividad inicial del biocatalizador. CalB-Diaion (cuadrados), CalB-MCI (triángulos), CalB-C18(círculos), Novo435(rombos). 35
- Figura 5. Inactivación de los biocatalizadores de CalB cuando fueron incubados en una disolución al 50% de acetonitrilo en tampón Trizma-base 50mM pH7. Los biocatalizadores se prepararon con una carga enzimática de 20mg/g y se compararon con el biocatalizador comercial Novo435. El seguimiento de la actividad se realizó por medida estándar de la actividad con p-NPB. CalB-Diaion (cuadrados), CalB-MCI (triángulos), CalB-C18(círculos), Novo435(rombos). 35
- Figura 6. Inmovilización de las enzimas TLL(a), RML(b) y Lecitasa(c) en los soportes octyl (círculos) y MCI (triángulos) a 25°C. Se prepararon muestras en las que se ofrecieron 3mg de enzima por g de soporte; la actividad se midió con p-NPB. La actividad residual se refiere a la comparación de la actividad del sobrenadante en cada punto, con la actividad de la disolución enzimática ofrecida en la inmovilización. 38
- Figura 7. Efecto de la incubación en acetonitrilo de los biocatalizadores de las lipasas TLL(a), RML(b), y Lecitasa(c) inmovilizados en los soportes MCI (triángulos) y octyl (círculos), en una disoluciones con 80% (TLL), y 30% (RML y Lecitasa) (v/v) de acetonitrilo en tampón Trizma-

- base 50mM pH7. La incubación de los biocatalizadores, con una carga enzimática de 3mg/g, se realizó a 25°C.....39
- Figura 8. Curso de la reacción de transesterificación de los biocatalizadores estudiados bajo condiciones óptimas, Novo435 (rombos), CalB-MCI (triángulos).....45
- Figura 9. Efecto de la reutilización en la actividad de los biocatalizadores. Se representa la actividad relativa en cada ciclo respecto a la actividad inicial (100%). Los símbolos con fondo representan aquellas reacciones en las que se aplicó el lavado con hexano entre ciclos. Los símbolos que representan a los biocatalizadores son, triángulos, para CalB-MCI, y rombos, Novo435.....45
- Figura 10. Esterificación catalizada por los biocatalizadores comerciales, Novo435, TL-IM, y RM-IM. Las condiciones de reacción fueron, 0.1M de ácido y alcohol (razón molar 1:1), una concentración de biocatalizador del 10%(respecto a la fracción másica de sustrato) y una temperatura de 40°C, para Novo435, y RM-IM, y para TL-IM, 30% y 50°C. En el diagrama de barras se representan por colores, los alcoholes: el azul representa el etanol; el morado, el 2-propanol; el rosa, el 1-butanol, y el verde, el 1-pentanol.....47
- Figura 11. Curso de las reacciones de esterificación para los tres biocatalizadores comerciales en las condiciones óptimas. Producción de acetato de pentilo catalizada por Novo435 (rombos), 50°C, razón molar 3:1, 7.75% biocatalizador, 0.25% agua. Butirato de pentilo, catalizado por RM-IM (círculos), 47.5°C, razón molar 2.4:1, 10% biocatalizador, 0.12% agua; y, butirato de etilo, catalizado por TL-IM (cuadrados), 32.5°C, razón molar 1.7:1, 40% biocatalizador, 0.38% agua.52
- Figura 12. Estabilidad de los biocatalizadores comerciales ante varios ciclos de reacción estudiada bajo las condiciones óptimas de operación: Novo435 (rombos), 50°C, razón molar 3:1, 7.75% biocatalizador, 0.25% agua. RM-IM (círculos), 47.5°C, razón molar 2.4:1, 10% biocatalizador, 0.12% agua; y TL-IM (cuadrados), 32.5°C, razón molar 1.7:1, 40% biocatalizador, 0.38% agua.52
- Figura 13. Electroforesis SDS-PAGE de los biocatalizadores de CalB. Canal 1, marcado de peso molecular (kDa), canal 2: CalB-MCI, canal 3: Novo435.....54
- Figura 14. Efecto de la concentración de ácido acético en la velocidad de inicial de reacción de los biocatalizadores de CalB, Novo435 (rombos), CalB-MCI (triángulos). Las condiciones de

reacción fueron: 10% de biocatalizador (referido a la suma de las masas de sustrato), 30°C, y razón molar 1:1 (n-butanol: acético)..... 54

Figura 15. Efecto de la razón molar en la velocidad inicial de esterificación catalizada por los biocatalizadores de CalB, Novo435 (rombos), y CalB-MCI (triángulos). Las condiciones de reacción fueron: 0.3M, concentración de ácido, 10% de biocatalizador (referido a la suma de las masas de sustrato), y 30°C..... 55

Figura 16. Evaluación del efecto de la cantidad de biocatalizador usado en la velocidad inicial del biocatalizador. La cantidad de biocatalizador se refiere al porcentaje de la suma de las masas de sustrato. Se utilizó una concentración de 0.3M de sustrato y 30°C. Novo435 (rombos), razón molar, alcohol:ácido, 3:1, CalB-MCI (triángulos), razón molar 5:1..... 56

Figura 17. Efecto de la cantidad de agua añadida en la velocidad inicial de esterificación. Se utilizó una concentración de sustrato de 0.3M, y 30°C una razón molar para Novo435 de 3:1, y de 5:1 para CalB-MCI, y un 10% de biocatalizador para ambos. La cantidad de agua añadida y biocatalizador se refiere al porcentaje de la suma de las masas de sustrato. Novo435(rombos), CalB-MCI (triángulos). 56

Figura 18.Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de formación del acetato de butilo bajo las condiciones óptimas de las variables estudiadas. Novo435 (rombos), concentración de ácido acético 0.3M, razón molar 3:1, 10% biocatalizador, 0.8% de agua inicial. CalB-MCI (triángulos), concentración de ácido acético 0.3M, razón molar 5:1, 10% biocatalizador, 0.4% de agua inicial..... 57

Figura 19. Curso de la esterificación bajo las condiciones óptimas establecidas para cada biocatalizador. La concentración de los sustratos fue de 0.3M y un 10% de biocatalizador respecto a la masa de sustrato para ambos biocatalizadores. Novo435 (rombos) 3:1 alcohol:ácido, 0.8% cantidad de agua (respecto a la masa de sustrato), y 35°C. CalB-MCI (triángulos), 5:1 alcohol:ácido, 0.4% de agua, y 40°C. 58

Figura 20 Estabilidad de los biocatalizadores Novo435 (rombos), y CalB-MCI (triángulos) en sucesivas etapas de esterificación. Ambos biocatalizadores operaron bajo condiciones óptimas. Novo435, 3:1 alcohol:ácido, 0.8% cantidad de agua (respecto a la masa de sustrato), y 35°C; CalB-MCI (triángulos), 5:1 alcohol:ácido, 0.4% de agua, y 40°C. 58

- Figura 21. Efecto de la concentración de ácido butírico sobre la velocidad inicial de esterificación. Novo435 (rombos), CalB-MCI (triángulos). Condiciones de reacción: contenido de biocatalizador 5%, razón molar 1:1 etanol: ácido butírico, y temperatura 37°C.....59
- Figura 22. Curso de la esterificación en las condiciones óptimas propuestas por el modelo para los dos biocatalizadores de CalB. Novo435(rombos), temperatura 37°C, razón molar (etanol:butírico) 5:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua. CalB-MCI (triángulos), temperatura 44°C, razón molar (etanol:butírico) 4:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua.63
- Figura 23. Estabilidad operacional de los biocatalizadores de CalB en sucesivos ciclos de esterificación. La síntesis del butirato de etilo tuvo lugar en condiciones óptimas Novo435(rombos), temperatura 37°C, razón molar (etanol:butírico) 5:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua. CalB-MCI (triángulos), temperatura 44°C, razón molar (etanol:butírico) 4:1, 7.5% biocatalizador, 0.25% de agua. Se distinguen las muestras tratadas con n-hexano (símbolos coloreados) y las muestras sin tratamiento (símbolos vacíos).....64
- Figura 24. Electroforesis de los biocatalizadores de la enzima TLL. Canal 1: marcador de peso molecular, canal 2: TLL-MCI, canal 3 : TL-IM.....65
- Figura 25. Efecto de la concentración de ácido butírico sobre la velocidad inicial de esterificación (a), TL-IM (rombos), TLL-MCI (triángulos) y, (b) sobre el curso de la reacción. TL-IM (rombos), TLL-MCI (triángulos). Símbolos abiertos 0.1M, y cerrados 0.5M de ácido butírico.66
- Figura 26. Velocidad inicial de la esterificación del butirato de butilo en función de la razón molar de los substratos (n-butanol: ácido butírico). Reacción con, una cantidad de biocatalizador de 30% para TL-IM, y un 10% para TLL-MCI (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica); una concentración de ambos substratos 0.7M y 30°C. TLL-MCI (triángulos), TL-IM (rombos).....67
- Figura 27. Efecto de la cantidad de agua añadida en la velocidad inicial de esterificación de los biocatalizadores: TL-IM (rombos), y TLL-MCI (triángulos). Las condiciones de reacción fueron: concentración de ambos substratos 0.7M, temperatura 30°C, razón molar (n-butanol:ácido butírico) 2:1 para TL-IM, y 1:1 para TLL-MCI. La cantidad de biocatalizador fue, 30% para TL-IM, y un 10% para TLL-MCI (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica).....67

- Figura 28. Efecto de la temperatura en la velocidad inicial de la esterificación para los dos biocatalizadores. Condiciones de reacción: concentración de ambos substratos 0.7M, TL-IM (rombos), 2:1 (n-butanol:ácido butírico), 30% cantidad de biocatalizador y 0.25% de agua (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica).TLL-MCI (círculos), razón molar 1:1, cantidad de biocatalizador 10%, y 0% de agua. 68
- Figura 29.Efecto de la cantidad de biocatalizador sobre la esterificación. El porcentaje de biocatalizador está referido a la suma de los substratos en relación estequiométrica. Las condiciones de operación fueron: concentración de ambos substratos 0.7M, temperatura 50°C. TL-IM (rombos), 2:1 (n-butanol: ácido butírico), 0.25% de agua (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica).TLL-MCI (círculos), razón molar 1:1, y 0% de agua..... 69
- Figura 30 Curso de la síntesis del butirato de butilo bajo condiciones óptimas para ambos biocatalizadores: concentración de ambos substratos 0.7M, temperatura 50°C. TL-IM (rombos), 2:1 (n-butanol: ácido butírico), 0.25% de agua, 40% de biocatalizador (referido a la suma de las masas de los substratos en relación estequiométrica).TLL-MCI (círculos), razón molar 1:1, y 0% de agua, 10% de biocatalizador..... 70
- Figura 31.Esterificación del ácido acético y el n-butanol catalizada por CalB-MCI con agitación por ultrasonidos. Se utilizó 0.3M de ácido en ambos experimentos. Condiciones: óptimo I (triángulos), 48.8°C, razón molar 3.46:1, 7.5% biocatalizador, y 0.28% de agua (suma de las masas de substrato sobre razón estequiométrica). Óptimo II (círculos), 60°C, razón molar 1:1, 5% biocatalizador, y 0% de agua. 73
- Figura 32. Estabilidad operacional del biocatalizador CalB-MCI en sucesivos ciclos de esterificación, bajo las condiciones óptimas. Se utilizó 0.3M de ácido en ambos experimentos. Óptimo I (triángulos), 48.8°C, razón molar 3.46:1, 7.5% biocatalizador, y 0.28% de agua (suma de las masas de substrato sobre razón estequiométrica). Óptimo II (círculos), 60°C, razón molar 1:1, 5% biocatalizador, y 0% de agua. 74
- Figura 33. Efecto de la concentración de ácido sobre el curso de la esterificación catalizada por CalB-MCI. Las condiciones fueron 48.8°C, razón molar 3.46:1, 7.5% biocatalizador, y 0.28% de agua (suma de las masas de substrato sobre razón estequiométrica). Concentración de ácido 0.3M (triángulos), 2M (círculos)..... 74

10.3 Índice de tablas

Tabla 1. Resultados del ensayo para determinar la capacidad de carga de la lipasa CalB en los soportes hidrofóbicos, MCI, C18 y Diaion.	34
Tabla 2. Actividad específica de la hidrólisis de los diferentes biocatalizadores con los tres sustratos analizados. Las reacciones de hidrólisis se llevaron a cabo a pH7 y 25°C.	36
Tabla 3. Actividad de los biocatalizadores preparados y el biocatalizador comercial, Novo435, para los tres sustratos estudiados.....	36
Tabla 4. Capacidad de carga de las enzimas TLL, RML y Lecitasa en los soportes hidrofóbicos, octyl y MCI. Su determinación se llevó a cabo según lo descrito en la sección 0.	37
Tabla 5. Vidas medias de los biocatalizadores de la enzima TLL, RML y Lecitasa a diferentes valores de pH cuando fueron incubados en baños termostático a 45°C (TLL y RML), y 50°C (lecitasa). La actividad en la suspensión fue medida periódicamente con p-NPB y comparada con la actividad inicial. *El biocatalizador TLL-octyl conservó el 90% de la actividad después de 10h de incubación a 45°C.	39
Tabla 6. Efecto del pH en la actividad de los biocatalizadores frente a p-NPB. Los biocatalizadores de TLL, RML y Lecitasa con carga enzimática de 3mg/g, fueron resuspendidos en tampón fosfato 10mM pH7 y se midió la actividad a diferentes pH. La actividad específica está definida como la cantidad de producto (μmol) obtenido por minuto y mg de enzima inmovilizada.	40
Tabla 7. Actividad específica de los biocatalizadores a diferentes valores de pH en reacciones de hidrólisis de los ésteres, D,L-mandelato de metilo, hexanoato de etilo y fenilacetato de metilo. Los valores de actividad se dan por nmol de éster hidrolizado ($\text{IU}\cdot 10^{-3}$) por minuto y mg de enzima.	40
Tabla 8. Actividad por g de biocatalizador del biocatalizador TLL-MCI, y RML-MCI y los biocatalizadores comerciales TL-IM, y RM-IM, en las reacciones de hidrólisis estudiadas a diferentes valores de pH. Se utilizaron biocatalizador de TLL-MCI y RML-IM preparados con una carga enzimática de 50mg/g.	41
Tabla 9. Variables del diseño experimental y sus valores reales a cada nivel de codificación. Siendo x_1 , la razón molar de sustrato (metanol: aceite), x_2 , la cantidad de enzima (% de la fracción	

másica de aceite), y x_3 , la cantidad de agua añadida inicialmente (% fracción másica de aceite).	42
Tabla 10. Matriz del diseño compuesto central con los valores codificados de las variables, X_1 , X_2 , X_3 . Experimentos propuestos a partir del diseño experimental y resultados de la experimentación expresados en velocidad inicial de la transesterificación ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), para el biocatalizador CalB-MCI, y Novo435.	42
Tabla 11. Resultados del análisis estadístico del modelo polinómico de segundo orden donde se indican los efectos lineal, cuadráticos y las interacciones de las variables para los biocatalizadores CalB-MCI, y Novo435.	43
Tabla 12. Valores experimentales de las variables que maximizan la velocidad inicial en la transesterificación de aceite de soja utilizando los biocatalizadores CalB-MCI, y Novo435. Valores obtenidos del análisis estadístico del modelo de diseño experimental.....	44
Tabla 13. Matriz del diseño experimental con cuatro variables, X_1 , X_2 , X_3 , y X_4 . Conjunto de experimentos donde se indican los niveles codificados de las variables y resultado de la experimentación para cada biocatalizador, expresado en porcentaje de la conversión de esterificación. La esterificación se midió a las 2h para Novo435 y RM-IM, y a las 5h para TL-IM.....	50
Tabla 14. Efectos lineales del modelo de regresión del diseño compuesto central, para las reacciones catalizadas por los tres biocatalizadores comerciales.	51
Tabla 15. Condiciones óptimas de las variables para obtener el máximo de respuesta según la predicción del diseño experimental.....	51
Tabla 16. Variables del diseño experimental compuesto central propuesto para la optimización de la conversión de síntesis del butirato de etilo para los biocatalizadores de CalB. Valores de las variables para cada nivel. El porcentaje de biocatalizador y cantidad de agua se refieren a la suma de las masas de los sustratos en relación estequiométrica.	59
Tabla 17. Matriz del diseño experimental y resultados experimentales para la conversión a butirato de etilo en 1h de reacción, para Novo435 y CalB-MCI. X_1 (temperatura, °C) X_2 (razón molar, etanol:butírico) X_3 (biocatalizador, %), X_4 (agua, %).	62
Tabla 18. Valores óptimos para la conversión en 1h de reacción, para los biocatalizadores de CalB.	63

Tabla 19. Matriz del diseño de la esterificación del ácido acético y el n-butanol catalizada por el biocatalizador preparado CalB-MCI con ultrasonidos. La concentración inicial de sustrato fue 0.3M.	70
Tabla 20. Valores de las variables del diseño en cada nivel de codificación. En el contenido de biocatalizador y de agua, el porcentaje está referido a la suma estequiométrica de ácido acético y de n-butanol.....	71
Tabla 21. Valores óptimos de las variables de operación para la síntesis de acetato de butilo catalizada por CalB-MCI. Óptimo I (análisis estadístico), óptimo II (análisis de efectos lineales).	72
Tabla 22. Comparación de las condiciones de operación óptimas y resultados de la síntesis del acetato de butilo catalizada por los biocatalizadores de CalB, Novo435 y CalB-MCI. *Datos tomados del artículo Martins A.B. y col. 2013b.	75